

**Etablierung eines Modellsystems zur zellulären und
biochemischen Phänotypisierung von Prionproteinen
unter Verwendung von GFP-PrP-Chimären**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Holger Lorenz
aus
Northeim

München, den 21. September 2001

Lorenz, Holger:

Etablierung eines Modellsystems zur zellulären und biochemischen Phänotypisierung von Prionproteinen unter Verwendung von GFP-PrP-Chimären

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neuropathologie (Direktor: Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. Thomas Cremer

2. Gutachter

PD Dr. Hans Weiher

Tag der mündlichen Prüfung:

17.01.2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Die übertragbaren spongiformen Enzephalopathien oder Prionkrankheiten	1
1.2 Molekularbiologie der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien oder Prionkrankheiten	3
1.3 Studien zur Pathogenese der TSEs	5
1.4 Studien zur Biogenese und Zellbiologie von PrP ^C , PrP ^{Sc} und PrP-Mutanten	10
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Enzyme und Antibiotika	15
2.1.3 „Kits“ zur Behandlung von DNA	16
2.1.4 DNA- und Protein-„Standards“	16
2.1.5 Verbrauchsmaterial zum Arbeiten mit Bakterien und eukaryontischen Zellen	17
2.1.6 Verbrauchsmaterial für „Western blots“	17
2.1.7 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA	18
2.1.8 Lösungen und Puffer für Proteinarbeiten und Arbeiten in der Zellkultur	19
2.1.9 Nährmedium für die Mikrobiologie	21
2.1.10 Medium für eukaryontische Zellen	21
2.1.11 Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen	21
2.1.12 Zellkulturmedium	22
2.1.13 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	22

II

2.1.14	Eukaryontische Zelllinien	22
2.1.15	Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotide	23
2.1.16	Plasmide	24
2.1.17	Immunologische Detektion	26
2.2	Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden	27
2.2.1	Lagerung von Bakterienstämmen	27
2.2.2	Stammhaltung von <i>E. coli</i> -Kulturen	27
2.2.3	Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung	27
2.2.4	Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.5	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	28
2.2.6	Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA	28
2.2.6.1	Fällung von DNA mit Ethanol	28
2.2.6.2	Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	29
2.2.6.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	29
2.2.6.4	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.2.7.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	30
2.2.7.2	Midipräparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)	30
2.2.7.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.8	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.9	Präparation von DNA für die Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	32
2.2.9.1	Auffüllen von 3'-zurückliegenden DNA-Enden	32
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	32
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.12	DNA-Sequenzanalyse	34
2.2.12.1	„Cycle sequencing“-Reaktionen	34
2.2.12.2	Das Sequenzgel	35

2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen und für Proteinarbeiten	36
2.3.1	Trypsinieren von Zellen	36
2.3.2	Einfrieren von Zellen	37
2.3.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	37
2.3.4	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	38
2.3.5	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	38
2.3.6	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	39
2.3.7	Immunfluoreszenzanalyse	39
2.3.8	Markierung von zellulären Bestandteilen und Zellorganellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	40
2.3.9	Enzymatische Abtrennung GPI-, „verankerter“ Proteine von der Zellmembran	40
2.3.10	Zelllyse und Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen	41
2.3.11	Deglykosylierung von Glykoproteinen	41
2.3.12	Proteinkonzentrationsbestimmung	41
2.3.13	Konzentrierung der Proteinextrakte	42
2.3.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.3.15	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine („Western blot“)	44
3.	Experimente und Ergebnisse	45
3.1	Etablierung eines Modellsystems zur Überprüfung des zellulären Transports in lebenden Zellen	45
3.1.1	Konstruktion einer PrP-Chimäre mit dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP)	45
3.2	Charakterisierung der GFP-PrP-Expression: Die biochemische und zelluläre Prozessierung von GFP-wtPrP ist vergleichbar mit der von nativem PrP	48
3.2.1	Biochemische Analyse der Biosynthese von GFP-wtPrP	48
3.2.2	Analyse der zellulären Prozessierung von GFP-wtPrP	51

3.2.2.1	GFP-wtPrP wird wie natives PrP entlang eines sekretorischen Pfades transportiert	51
3.2.2.2	GFP-wtPrP weist wie natives PrP eine GPI-„verankerte“ Membranständigkeit auf	56
3.2.2.3	GFP-PrP-Kontroll-Fusionsproteine weisen im Gegensatz zu GFP-wtPrP keinen sekretorischen Transport auf	57
3.3	Erweiterung des Modellsystems: Untersuchungen von PrP-Mutanten durch den Einsatz von GFP-PrP-Chimären	59
3.3.1	Konstruktion von GFP-PrP-Mutanten	59
3.3.2	Expression der GFP-PrP-Mutanten	62
3.3.2.1	Analyse der Biosynthese der GFP-PrP-Mutanten	62
3.3.2.2	Proteinase K-Resistenzanalyse der GFP-PrP-Mutanten	67
3.3.3	Lokalisationsstudien der GFP-PrP-Mutanten mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie	68
3.3.3.1	Einige GFP-PrP-Missense-Mutanten werden wie GFP-wtPrP sekretorisch zur Zellmembran transportiert	69
3.3.3.2	Die Nonsense-Mutanten GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X weisen eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf	72
3.3.3.3	Intrazelluläre Akkumulation der Glykosylierungs-Mutanten	76
3.3.3.4	Abnehmender Transport der GFP-PrP-Chimären zur Zellmembran mit zunehmender Anzahl der Oktapeptide von PrP	80
4.	Diskussion	84
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Internetseiten	124

Abkürzungen

A	Adenosin, auch Ampère
aa	Aminosäuren („amino acids“)
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
Ap ^r	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAA	N,N'-Methylenbisacrylamid
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
G	Guanosin

GPI	Phosphatidylinositolglykolipid
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
i. d. R.	in der Regel
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	Mikro (10^{-6})
M	molar
mA	Milliampère
MCS	multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
M_r	relatives Molekulargewicht
$M_r(k)$	angegebener Wert x 1000 entspricht relatives Molekulargewicht
mRNA	„messenger“-RNA
mU	Milliunit(s), Enzymeinheit
N	Asparagin
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblautetrazolium
OD_x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Op	Oktapeptide
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
p	Pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC	Personalcomputer
PEG	Polyethylenglykol
PIPLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PK	Proteinase K

VII

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rN2a	einfach-stabil transfizierte N2a-Zellen
rN2a-tTA	einfach-stabil transfizierte N2a-Zellen, die den Tetracyclin-Transaktivator synthetisieren
rrN2a	doppelt-stabil transfizierte N2a-Zellen
rrN2a-tTA	doppelt-stabil transfizierte N2a-Zellen, die den Tetracyclin-Transaktivator synthetisieren
rrN2a-tTA-PrP	rrN2a-tTA-Zellen nach einer Transfektion mit einem induzierbaren PrP-Expressionsvektor
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin
t	Zeit
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tTA	Tetracyclin-Transaktivator
U	Unit(s), Enzymeinheit, auch Uridin
u. a.	unter anderem, unter anderen
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Die übertragbaren spongiformen Enzephalopathien oder Prionkrankheiten

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI, „fatal familial insomnia“) des Menschen, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Traberkrankheit (Scrapie) beim Schaf repräsentieren eine Gruppe vererbbarer oder sporadisch auftretender bzw. übertragener, stets tödlich verlaufender degenerativer Krankheiten des zentralen Nervensystems, welche als übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSEs, „transmissible spongiform encephalopathies“) oder Prionkrankheiten bezeichnet werden (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921; Gerstmann *et al.*, 1936; Gajdusek & Zigas, 1959; Manetto *et al.*, 1992; Medori *et al.*, 1992; Goldfarb *et al.*, 1992). Neuropathologische Kennzeichen aller TSEs sind in unterschiedlich starker Ausprägung auftretende schwammartige Läsionen, massiver Nervenzellverlust, die Aktivierung von Gliazellen (Astrogliose) und Ablagerungen des Prionproteins im Gehirn. Die Übertragbarkeit der TSE und somit die Existenz eines, wenn auch zu dem damaligen Zeitpunkt noch unbekannten, infektiösen Agens konnte bereits Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts sowohl innerhalb einer Spezies als auch über Speziesgrenzen hinweg nachgewiesen werden (Cuillé & Chelle, 1936; Gordon, 1946; Chandler, 1961). Zahlreiche Übertragungen von Scrapie auf die hinsichtlich der kurzen Inkubationszeit tierexperimentell sehr geeigneten Hamster und Mäuse, als auch z. B. von Kuru auf Schimpansen (Gajdusek *et al.*, 1966) und BSE auf Makaken (Lasmézas *et al.*, 1996a) und Schafe (Houston *et al.*, 2000) wurden seitdem erfolgreich beschrieben. Dem massiven Ausbruch der BSE ab Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, der zu einer zeitweiligen Epidemie der Rinderkrankheit in Großbritannien und zu einem, wenn auch quantitativ deutlich geringeren Auftreten der Krankheit bis in die Gegenwart in Kontinentaleuropa (Portugal, Nordirland, Schweiz, Frankreich, Deutschland, Italien, Belgien, Niederlande) führte, folgte ab Mitte der neunziger Jahre das Auftauchen einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit („vCJD“ oder auch „nvCJD“) in Großbritannien (Will *et al.*, 1996) und in Frankreich (Chazot *et al.*, 1996, Deslys *et al.*, 1997). Dieser Krankheit, die sich von den klassischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheiten durch eine abweichende Neuropathologie diagnostizieren lässt, sind bislang 88, darunter

auffällig viele junge Menschen zum Opfer gefallen (85 bestätigte Fälle in Großbritannien, zwei in Frankreich, einer in Irland; Stand März 2001, Quelle: Department of Health, UK; Oppenheim *et al.*, 2000; Zeidler & Ironside, 2000). Das zeitlich eng aufeinander folgende Erscheinen zweier vormals unbekannter Krankheiten warf die Frage auf, ob vCJD auf eine Infektion der Betroffenen mit dem BSE-Erreger durch den Konsum kontaminierter Schlachtprodukte zurückzuführen ist (Collinge *et al.*, 1995, 1996; Ridley & Baker, 1996). Durch Arbeiten von Bruce *et al.* (1997) wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu den anderen, herkömmlichen Prionkrankheiten, die Rinderkrankheit BSE und vCJD beim Menschen identische Erregerstamm-Kriterien aufweisen und somit ein kausaler Zusammenhang beider Krankheiten angenommen werden kann (Priola, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Aufgrund zu vieler ungeklärter Fragen wie z. B. der ungewissen Inkubationszeit der neuen Variante, einer möglicherweise existierenden genetischen Prädisposition und der für epidemiologische Untersuchungen noch zu geringen Datenmenge über nvCJD entbehren seriöse Aussagen bezüglich des Ansteckungsrisikos und der Gesamtzahl der bereits infizierten Personen zur Zeit jedoch noch jeglicher Grundlage.

Die Eigenschaft des infektiösen Agens, also des TSE-Erregers, resistent gegenüber Nukleinsäure-zerstörenden physikochemischen Behandlungen wie UV- bzw. ionisierender Strahlung, großer Hitze und Formaldehyd zu sein, führten bereits 1967 zu der Vermutung, dass als Auslöser der TSE bei der Übertragung von Scrapie anstelle einer Nukleinsäure ein Protein als maßgebliche, wenn nicht einzige Komponente des infektiösen Partikels vorliegt (Alper *et al.*, 1966, 1967; Griffith, 1967). Dieses untermauernd beschrieben Prusiner *et al.* (1982) einen ausschließlich in Scrapie-infizierten Hirnpräparationen aufgefundenen Proteinkandidaten und führten als Bezeichnung der infektiösen Einheit den Begriff „Prion“ als Kürzel für „proteinaceous infectious particle“ zur Unterscheidung von „konventionellen“ Erregern wie Bakterien, Viren oder Viroiden ein. Die dazugehörige und von Prusiner 1982 erstmals vorgestellte Prion-Hypothese deklarierte einen gänzlich neuen Übertragungsweg biologischer Informationen, bei dem eine abnorme, infektiöse Isoform eines zellulären Proteins ihre Informationsverbreitung durch die Umbildung des normalen, zellulären Pendantes katalysiert. Die Replikation des übertragbaren Agens, also des Prions, geschieht dabei nicht durch Information-vermittelnde Nukleinsäuren, sondern durch posttranslationelle Modifikationen eines endogenen Proteins (zusammengefasst in Prusiner, 1998).

1.2. Molekularbiologie der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien oder Prionkrankheiten

Biochemische Untersuchungen von elektronenmikroskopisch erkennbaren und als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnete makromolekularen Strukturen in TSE-infizierten Hirngewebspräparationen führten zu der Entdeckung des so genannten Prionproteins (PrP), das anhand seiner Migration in der SDS-PAGE auch als PrP 27-30 (Merz *et al.*, 1981, Bolton *et al.*, 1982) bezeichnet wurde. SAF-angereicherte Präparationen erwiesen sich als hochinfektiös (Prusiner *et al.*, 1983, Diringer *et al.*, 1983) und Aufreinigungen infizierter Hirnextrakte erbrachten eine gemeinsame Anreicherung sowohl von PrP 27-30 als auch der Infektiösität um das mehr als Tausendfache und wurden als Hinweis für eine Korrelation der Infektiösität mit einer bestimmten Form des Prionproteins als pathogenen Faktor gedeutet (Gabizon *et al.*, 1988). Des weiteren konnte in immunochemischen Untersuchungen eine Reaktivität von anti-PrP-Antikörpern gegen die in Hirnen Scrapie-infizierter Tiere und CJD-Patienten auffindbaren Amyloidablagerungen (Plaques) und somit die Anwesenheit des Prionproteins in diesen Plaques nachgewiesen werden (Bendheim *et al.*, 1984; Kitamoto *et al.*, 1986). PrP 27-30 erwies sich als der Protease-resistente Kernbereich des krankheitsspezifischen und als PrP^{Sc} (Sc für Scrapie; synonym wird von manchen auch PrP-res verwendet) bezeichneten Proteins, welches durch einen definierten Verdau mittels Proteinase K (PK) nicht vollständig degradiert wird. Von PrP 27-30 wurde die NH₂-terminale Aminosäuresequenz bestimmt (Prusiner *et al.*, 1984) und die dazu korrespondierenden Oligonukleotidsonden weiterverwendet um PrP-cDNA-Klone von Hamster (Oesch *et al.*, 1985) und Maus zu identifizieren (Chesebro *et al.*, 1985, Loch *et al.*, 1986). Mit Hilfe dieser cDNA-Klone konnte ein singuläres („single copy“) Gen sowohl in infizierten als auch nicht-infizierten Hirnen detektiert werden. Das Prionprotein-Gen des Menschen (*PRNP*) befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosomen 20 und das der Maus (*Prnp*) auf der syntenischen Region des Chromosoms 2. Für die PrP-Promotorregion wurden u. a. mehrere Kopien eines GC-Nonamers beschrieben, welche möglicherweise als Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 fungieren (McKnight & Tjian, 1986). TATA-Sequenzen (Goldberg-Hogness-Boxen) sind nicht vorhanden. Die PrP-cDNAs kodieren für Prionproteine von 254 (Maus und Hamster) bzw. 253 Aminosäuren (Mensch), unbeeinträchtigt davon, ob sie von einem infizierten oder nicht-infizierten Individuum

stammen (Oesch *et al.*, 1985, Chesebro *et al.*, 1985, Basler *et al.*, 1986; Loch *et al.*, 1986, Kretzschmar *et al.*, 1986). Als normales, zelluläres Genprodukt wurde ein als PrP^C (C für „cellular“) bezeichnetes Protein von 27-35 kDa identifiziert, das wie die pathogene Isoform, PrP^{Sc}, neben einer unglykosylierten auch in ein- und zweifach- (Asparagin-gebundenen) glykosylierten Formen vorkommt (Bolton *et al.*, 1985, Endo *et al.*, 1989, Haraguchi *et al.*, 1989). Der offene Leserahmen aller bisher bekannten Prionprotein-Gene von Säugern und Vögeln befindet sich innerhalb eines Exons, so dass die Möglichkeit eines alternativen RNA-Spleißens zur Entstehung von PrP^C und PrP^{Sc} ausgeschlossen werden kann (Basler *et al.*, 1986, Westaway *et al.*, 1987, Gabriel *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass sich der mRNA-Spiegel von PrP während des Verlaufs einer Scrapie-Infektion kaum verändert und dass keine PrP-spezifischen Nukleinsäuren in aufgereinigten Prionpräparationen auffindbar sind (Oesch *et al.*, 1985). Der Gehalt an Nukleinsäuren pro Infektionseinheit wurde in aufwendigen Erhebungen statistisch auf weniger als ein Molekül von 100 bp Länge ermittelt (Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1992, 1993). Des weiteren konnten zwischen PrP^C und PrP^{Sc} keinerlei Modifikationen durch differierende kovalente Bindungen innerhalb des Proteins festgestellt werden (Stahl *et al.*, 1993). Die zelluläre Form des Prionproteins, PrP^C, zeigte jedoch im Gegensatz zu PrP^{Sc} eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber Proteinase K, die unter definierten Bedingungen zu einem vollständigen Abbau des Proteins führt. Obwohl mögliche Unterschiede in den komplex arrangierten Glykoformen (Endo *et al.*, 1989, Haraguchi *et al.*, 1989; Stahl *et al.*, 1993; Rudd *et al.*, 1999; Stimson *et al.*, 1999) nicht ausgeschlossen werden können, scheint der essentielle Unterschied von PrP^C zu PrP^{Sc} in dem Einnehmen unterschiedlicher Proteinkonformationen begründet zu liegen (Pan *et al.*, 1993, Tatzelt *et al.*, 1996).

Physikalische Meßmethoden, wie die Fourier-Transformations-Spektroskopie ermittelten für PrP^C einen α -helikalen Anteil von ca. 40 % und sehr wenige bis keine β -Faltblattstrukturen (Pan *et al.*, 1993). Durch Untersuchungen der magnetischen Kernresonanzen (NMR) eines sich in Lösung befindlichen PrP^C(121-231)-Fragmentes und eines rekombinanten PrPs der Maus (mPrP 23-231) konnte der hohe α -helikale Anteil und der sehr geringe β -Faltblatt-Anteil in der Sekundärstruktur bestätigt werden (Riek *et al.*, 1996, 1997). Im Gegensatz wurde für PrP^{Sc} ein β -Faltblatt-Anteil von ca. 50 % und ein α -Helix-Anteil von ca. 20 % beschrieben (Caughey *et al.*, 1991c; Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993). Die vollständige Aufklärung der posttranslationellen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} konnte noch nicht erbracht werden. Wie PrP^{Sc} auf molekularer Ebene entsteht und

nach der Prion-Hypothese als entscheidende Komponente die Konformationsänderung des endogenen PrP^C bewerkstelligt, ist nicht bekannt. Es wurden bislang zwei voneinander abweichende Theorien für die Umfaltung eines nativen Proteins in eine andere, pathogene Konformation durch eine bereits umgefaltete Isoform beschrieben. Das „refolding“- oder „Prusiner-Modell“ schlägt diesbezüglich eine Ent- und anschließende Neufaltung von PrP^C unter dem Einfluss von PrP^{Sc} vor, bei der die Überwindung der dazu benötigten, hohen Aktivierungsenergie durch eine Katalyse von bereits existierendem PrP^{Sc} bewerkstelligt wird (Prusiner, 1991). Bei dem „Lansbury-Modell“ (auch als „nucleation“- oder „seeding“-Modell bezeichnet) befindet sich PrP^C mit PrP^{Sc} bzw. einem PrP^{Sc}-Vorläufer in einem Gleichgewichtszustand zugunsten des stabileren PrP^C. Zu einer Stabilisierung und Akkumulation von PrP^{Sc} kommt es nur durch das Vorhandensein eines PrP^{Sc}-Aggregates („seed“), welches aufgrund der Addition von PrP^{Sc}-Molekülen eine fortlaufende Polymerisierung erfährt. Die initiale Bildung des PrP^{Sc}-Aggregates wird dabei als kinetisch kontrolliert und extrem langsam beschrieben; ist das Aggregat jedoch erst einmal entstanden, findet eine schnelle PrP^{Sc}-Addition und eine Vervielfältigung des pathogenen Agens statt (Jarret & Lansbury, 1993, Come *et al.*, 1993). Beide Theorien wurden hinsichtlich ihrer prototypischen Eignung in einer vergleichenden kinetischen Analyse anhand biophysikalischer Kriterien als möglich bzw. gleich wahrscheinlich bewertet (Eigen, 1996).

In reinen *in vitro*-Konversionsexperimente konnte jedenfalls eine *de novo*-Anreicherung von Infektiösität noch nicht erreicht werden. Die Experimente führten zwar zu der Umwandlung von PrP^C zu einer PK-resistenten Form; die Neubildung infektiöser Einheiten konnte jedoch, möglicherweise auf Grund einer zu geringen Konversionseffizienz, noch nicht gezeigt werden (Kocisko *et al.*, 1994; Bessen *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999).

1.3. Studien zur Pathogenese der TSEs

Durch zahlreiche Studien mit transgenen Tieren konnte der Einfluss der PrP-Isoformen auf die Übertragbarkeit und Pathogenese der TSEs näher beschrieben werden. So zeigten Wildtyp-Mäuse, nachdem ihnen als Transgen Hamster-PrP eingefügt wurde, dass die existierende Speziesbarriere bezüglich der Infektion mit bestimmten Scrapie-Prionen von

Hamster aufgehoben werden konnte (Scott *et al.*, 1989). Der Begriff Speziesbarriere beschreibt dabei das Phänomen, dass die Übertragung einer TSE zwischen verschiedenen Spezies oft nur eingeschränkt möglich ist und mit schwankenden bzw. erheblich verlängerten Inkubationszeiten einhergeht. Wird das infektiöse Agens dann in der neuen Spezies weiter passagiert, geschieht dies mit einer weitaus höheren Effizienz und konstanten Inkubationszeiten. Die oben erwähnten Mäuse, die sowohl Maus- als auch Hamster-PrP^C synthetisieren, zeigten nach einer intracerebralen Inokulation mit Hamster-Prionen die speziesspezifische Scrapie-Neuropathologie und die Bildung neuer Hamster-Prionen. Wurden die transgenen Mäuse jedoch mit Prionen der Maus infiziert, zeigten sie die für Maus charakteristische Neuropathologie und Inkubationszeiten, die denen nicht-transgener Mäuse entsprach. Des weiteren konnte eine Korrelation der Inkubationszeiten mit der Expressionsstärke der Hamster-PrP-Gene beschrieben werden, da Mäuse mit wenigen Kopien des Transgens eine deutlich längere Inkubationszeit nach einer Inokulation mit Scrapie-Prionen von Hamster aufwiesen als Mäuse mit einer größeren Kopienanzahl (Prusiner *et al.*, 1990, Prusiner & DeArmond, 1994). Die Ergebnisse wurden so gedeutet, dass Hamster-Prionen als Erreger in der normalen Maus nur sehr ineffizient die Umwandlung von Maus-PrP^C zu PrP^{Sc} katalysieren und der Infektionsvorgang so lange verzögert wird bis genügend eigene Maus-PrP^{Sc}-Moleküle entstanden sind, die dann mit deutlich höherer Effizienz weitere Maus-PrP^C-Moleküle umfalten können. Durch die Expression des Hamster-PrP-Gens stellten die transgenen Mäuse den Hamster-Prionen ein homologes Substrat, nämlich Hamster-PrP^C, zur Verfügung, welches dann Dosis-abhängig mit zunehmender Expressionsstärke zu kürzeren Inkubationszeiten führte. Dass der Infektionsvorgang jedoch einzig von der Homologie des umzufaltenden PrP^C abhängig ist, wurde durch die Beobachtung in Frage gestellt, dass die Synthese von humanem PrP in transgenen Mäusen auch bei vielfacher Überexpression keinen Effekt auf die Speziesbarriere zwischen Maus und Mensch bei einer Infektion mit humanen Prionen zu haben scheint. Erst die Expression eines Chimären-Transgens, welches im zentralen Teil für die humane und an den Enden für die murine PrP-Sequenz kodiert, erhöhte die Empfänglichkeit dieser transgenen Mäuse für humane Prionen erheblich und wurde als Indiz für einen zusätzlichen zellulären Faktor („Protein X“ genannt) bei der Umfaltung von PrP^C nach PrP^{Sc} gedeutet (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997).

Die Bedeutung der endogenen PrP-Expression für die Übertragbarkeit von Prionkrankheiten konnte durch die Herstellung bzw. den Einsatz von „knockout“-Mäusen

näher erklärt werden. Die Mäuse mit einer homozygoten Zerstörung des endogenen PrP-Gens (*Prnp*^{0/0}) offenbarten eine absolute Resistenz gegenüber TSEs und die Unfähigkeit zur Bildung neuer Prionen (Büeler *et al.*, 1993), was im Rahmen der Prion-Hypothese als Indiz für die entscheidende Rolle des Prionproteins bei der Ausbildung einer TSE gedeutet wurde. Nachdem diesen Mäusen Hamster-PrP als Transgen eingefügt wurde, stellte sich nämlich eine Empfänglichkeit gegenüber Hamster- jedoch nicht gegenüber Maus-Prionen wieder ein. Zusätzlich wurde für *Prnp*-hemizygoten Mäuse (*Prnp*^{0/+}) ein deutlich langsamerer Krankheitsverlauf als bei *Prnp*^{+/+}-Mäusen (Wildtyp-Kontrollmäuse) nach einer Infektion mit Maus-Prionen beschrieben (Büeler *et al.*, 1994).

Mehrere *Prnp*-„knockout“-Mauslinien wurden seitdem beschrieben, die jedoch zur Aufklärung der bis heute nicht verstandenen zellulären Funktion des Prionproteins nur begrenzt beitragen konnten, da sie entweder unscheinbare oder nur schwer reproduzierbare Phänotypen zeigten. So wurden in einer Studie im Hippocampus der PrP^C-Null-Mutanten Abnormalitäten der GABA-vermittelten inhibitorischen Neurotransmission und abgeschwächte Langzeitpotenzierungen (LTP) beschrieben (Collinge *et al.*, 1994), die jedoch in anderen Studien nicht reproduziert werden konnten (Herms *et al.*, 1995; Lledo *et al.*, 1996).

In anderen „knockout“-Studien, die sich thematisch mit den interzellulären Übertragungswegen der Prionen befassten, wurde *Prnp*-überexprimierendes, nicht-infektiöses Nervengewebe in das Gehirn von *Prnp*^{0/0}-Mäusen implantiert. Nach einer intrazerebralen Inokulation mit Scrapie-Prionen kam es zu einer starken Akkumulation von PrP^{Sc} und der Anreicherung von Infektiösität innerhalb des Implantats. Dem *Prnp*-überexprimierenden Gewebe widerfuhren die für Scrapie charakteristischen pathologischen Veränderungen und es kam zu einer Diffusion von PrP^{Sc} in das umgebene, PrP^C-freie Gewebe. Dort konnten jedoch weder neuropathologische Anzeichen noch Anreicherungen von Infektiösität nachgewiesen werden (Brandner *et al.*, 1996a). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Infektionsausbreitung entlang der Nervenbahnen des ZNS die Anwesenheit von PrP^C zu benötigen scheint. Die PrP^C-Null-Mutanten-Mäuse (*Prnp*^{0/0}), die ein *Prnp*-exprimierendes Implantat aus Nervengewebe im Gehirn trugen, wurden diesmal intraokular mit Scrapie-Prionen inokuliert. Es zeigte sich, dass diese Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollmäusen keinerlei neuropathologische Anzeichen einer TSE bzw. Akkumulationen von PrP^{Sc} aufwiesen, also eine Übertragung der Scrapie-Infektion auf das Implantat entlang PrP^C-freier Zellen des ZNS nicht erreicht

wurde (Brandner *et al.*, 1996b). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass allein die extrazelluläre Exposition von PrP^{Sc} für die Entstehung bzw. Verbreitung der TSE-spezifischen Pathologie nicht ausreicht. Dazu scheint es der Neubildung von PrP^{Sc} innerhalb der Zellen, d. h. der Expression des endogenen Prionprotein-Gens zu bedürfen.

Des weiteren gesellt sich zu den Fragestellungen bezüglich der Mechanismen der Konformationsänderung zu pathogenen Prionproteinen auch das Auftreten verschiedener Erregerstämme oder „Prion-Isolate“ innerhalb einer Spezies, die mit unterschiedlichen klinischen und neuropathologischen Merkmalen bereits für mehrere TSEs beschrieben wurden. So konnten nach Passagen einzelner Scrapie-Isolate in isogenen Mäusen deutlich unterschiedliche Inkubationszeiten der Krankheiten und verschiedene Muster der PrP^{Sc}-Verteilung im Gehirn reproduzierbar nachgewiesen werden (Kimberlin *et al.*, 1989, DeArmond *et al.*, 1993). Beim Hamster führten die Übertragungen der sogenannten „hyper“ (HY) und „drowsy“ (DY) TME-Stämme (TME für „transmissible mink encephalopathy“) bei Primärstruktur-identischen PrP-Molekülen zu definiert verschiedenen PrP-Formen mit unterschiedlichen PK-resistenten PrP^{Sc}-Molekülen (Bessen & Marsh, 1992, 1994). Vergleichbare Eigenschaften wurden auch für menschliche Prion-Isolate beschrieben. So konnte bei transgenen Mäusen, die genetisch identisch waren, nach einer Infektion mit humanen Prionen die Bildung von PrP^{Sc}-Molekülen gezeigt werden, die hinsichtlich der Konformation bzw. ihrer proteolytischen Resistenz gegenüber PK den Eigenschaften der PrP^{Sc}-Moleküle des Inokulats entsprachen (Telling *et al.*, 1996). Eine besondere Bedeutung erfuhren solche Analysen bei der Untersuchung der PrP^{Sc}-Muster aus Hirnpräparationen Verstorbener, die entweder an einer sporadischen bzw. iatrogenen CJD oder der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit litten. Durch einen Vergleich der un-, einfach- und zweifach-glykosylierten Prionproteine bezüglich ihrer Größe und ihres quantitativen Verhältnisses zueinander konnten die Unterschiede mittels „Western blot“-Analysen festgestellt und eine Typisierung der PrP^{Sc}-Moleküle, deren Primärstruktur bekannt war, vorgestellt werden (Collinge *et al.*, 1996, Parchi *et al.*, 1996, 1997). Es zeigte sich, dass das PrP^{Sc}-Muster der neuen Variante sich zwar von denen der anderen CJD-Formen unterschied, jedoch eine Übereinstimmung mit dem PrP^{Sc}-Muster vermutlich BSE-infizierter Tiere (Rinder, Makaken und Katzen) aufwies, welches als Indiz für die Entstehung von vCJD aus der Übertragung von BSE auf den Menschen angesehen wurde (Collinge *et al.*, 1996).

Obwohl in vielen tierexperimentellen Studien der effektivste Verbreitungsweg von TSEs via intracerebraler Prion-Inokulation durchgeführt wurde, stellt sich doch die Frage, wie im Falle von BSE und vCJD, aber auch anderer Prionkrankheiten wie Kuru oder der iatrogenen CJD, die Ausbreitung der Krankheit, also die Invasion ins ZNS innerhalb eines Individuums verläuft. Es konnte gezeigt werden, dass die Übertragung der Prionen nach einer peripheren Inokulation höchstwahrscheinlich über Zellen des lymphoretikulären Systems stattfindet (Kitamoto *et al.*, 1991; Lasmézas *et al.*, 1996b). Wurden immundefiziente Mäuse intraperitoneal mit Scrapie-Prionen inokuliert, so reagierten zwar Mäuse, deren T-Lymphozyten-Funktion zerstört war mit der Ausbildung der TSE, jedoch nicht solche Tiere, die einen B-Lymphozyten-Defekt aufwiesen. Auf Grund der Notwendigkeit dieses Zelltyps bei der Ausbildung der Krankheit wurde den differenzierten B-Lymphozyten zunächst eine entscheidende Rolle bei der Neuroinvasion des infektiösen Agens zugesprochen (Klein *et al.*, 1997). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Neuroinvasion auch mit B-Zellen möglich ist, die kein PrP^C synthetisieren, so dass dieser Zelltyp wohl eher eine indirekte Rolle beim Transfer der Prionen von der Peripherie zum ZNS einnimmt (Klein *et al.*, 1998). Dass zelluläres PrP (PrP^C) überhaupt in diversen Blutzellen synthetisiert wird, konnte anhand humaner PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) gezeigt werden, die eine PrP-Expression in B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Dendritenzellen aufweisen (Dürig *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde im Blut von Mensch und Maus kürzlich als zellulärer Interaktionspartner von PrP^{Sc} die Protease-Vorstufe Plasminogen beschrieben (Fischer *et al.*, 2000). Anhand von „Western blot“-Analysen und „Bioassays“ mit Indikatormäusen konnte gezeigt werden, dass Plasminogen selektiv sowohl PrP^{Sc} als auch Infektiösität (die Prionen) bindet, jedoch nicht mit der zellulären Isoform, PrP^C, interagiert. Welchen Beitrag dieser Befund zur Aufklärung der Pathogenese von TSEs leistet, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Mit Plasminogen wurde jedoch der erste endogene Faktor identifiziert, der eine Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} ermöglicht, und somit möglicherweise von diagnostischem Nutzen sein könnte.

1.4. Studien zur Biogenese und Zellbiologie von PrP^C, PrP^{Sc} und PrP-Mutanten

In einer Vielzahl von Studien mit transgenen Mäusen und Zellkultursystemen konnten Erkenntnisse über die Zellbiologie von PrP^C und seiner pathogenen Isoform gewonnen werden. Der zelluläre Weg von PrP^C beginnt, geleitet durch eine N-terminale Signalsequenz, im Endoplasmatischen Reticulum (ER), wo dem Protein zunächst Mannose-Zucker an die zwei vorhandenen N-Glykosylierungssequenzen an den Positionen 181-183 und 197-199 für Mensch-PrP (180-182 und 196-198 für Maus-PrP; „consensus sequence“: Asparagin-X-Threonin, X = Isoleucin oder Phenylalanin) angehängt werden. Des weiteren erhält PrP am C-Terminus einen Phosphatidylinositolglykolipid(GPI)-„Anker“ (Stahl *et al.*, 1987), so dass durch die Abtrennung des N-terminalen Signalpeptids und der C-terminalen GPI-Erkennungssequenz sich die Größe des Proteins bei Mensch- und Maus-PrP um 45 Aminosäuren auf 209 bzw. 210 Aminosäuren reduziert. Das Prionprotein erfährt anschließend im Golgi-Apparat eine Umwandlung der Mannose-Zucker hin zu komplexeren, hybriden Zuckerresten und gelangt schließlich als reifes Molekül an die Zelloberfläche, wo der überwiegende Anteil der PrP-Moleküle, verbunden über den GPI-„Anker“, extrazellulär vorliegt und mittels Phospholipasen (z.B. PIPLC) oder Proteasen (z.B. Trypsin) experimentell von der Membran entfernt werden kann (Caughey *et al.*, 1988, 1989, 1991a; Borchelt *et al.*, 1990, Shyng *et al.*, 1993). Die Halbwertszeit von PrP^C an der Zellmembran wurde mit 3-6 h beschrieben (Caughey *et al.*, 1989) und es konnte gezeigt werden, dass ein geringer PrP-Anteil ins Medium bzw. in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Tagliavini *et al.*, 1992). Die zelluläre Form des Prionproteins durchläuft also den „klassischen“ sekretorischen Weg eines membranständiges Proteins über den ER/Golgi-Komplex, erfährt dabei mehrere posttranslationelle Modifikationen und nimmt währenddessen seine korrekte Konformation mit der Ausbildung der α -helikalen Strukturen und einer Disulfidbrücke (Cys178-Cys213) im C-terminalen Bereich des Proteins ein.

Einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der für den zellulären Transport und Metabolismus von PrP^C und PrP^{Sc} bedeutsamen Sequenzmotive konnte der Einsatz definierter PrP-Mutanten leisten. Da dem Prionprotein während der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} gravierende Konformationsänderungen widerfahren, wurden Mutationen in PrP-Abschnitte eingefügt, die für die Ausbildung von Sekundärstrukturen als (mit)verantwortlich betrachtet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Prionproteine, die

Deletionen in α -helikalen Bereichen aufwiesen bzw. keine Disulfidbrücke mehr ausbilden konnten, ihre Fähigkeit, PK-resistentes PrP in Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen (ScN2a) zu bilden, verloren (Muramoto *et al.*, 1996; Yanai *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Deletionen in nicht bzw. kaum strukturierten Bereichen von PrP keinerlei Auswirkungen auf die Umwandelbarkeit von PrP^C zu PrP^{Sc}. So führte sowohl die Deletion der Aminosäuren 23-88 als auch das Entfernen der GPI-Erkennungssequenz (Aminosäuren 231-254) von Maus-PrP zu PK-resistentem PrP in ScN2a-Zellen (Rogers *et al.*, 1993). In transgenen Studien mit PrP-„knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch die Einbringung verkürzter PrPs, denen die Aminosäuren 69-84 und 32-80 (Fischer *et al.*, 1996) bzw. 32-93 (Flechsich *et al.*, 2000) fehlten, die Empfänglichkeit für Scrapie wieder hergestellt werden konnte und es nach einer Prion-Infektion zu einer (wenn auch reduzierten) Akkumulation von PrP^{Sc} in den Hirnen der Tiere kam. Diese Daten wurden als Hinweis gedeutet, dass der amino-proximale Bereich des reifen Prionproteins für die Bildung von PrP^{Sc} bzw. die Entstehung der TSE nicht von Bedeutung zu sein scheint. Für eine Funktion dieses Bereiches von PrP^C sprechen jedoch sowohl die verlängerten Inkubationszeiten (nach einer Prion-Infektion) dieser transgenen Mäuse (Flechsich *et al.*, 2000) als auch das Vorhandensein eines hoch konservierten Sequenzmotivs innerhalb dieser Region. So weisen alle bislang bekannten Prionproteine (außer Xenopus-PrP, unpublizierte Daten) im N-terminalen Bereich Tandem-Wiederholungen eines Peptids auf, für das eine Affinität zu Kupferionen beschrieben werden konnte (Hornshaw *et al.*, 1995; Schätzl *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997; Viles *et al.*, 1999; Wopfner *et al.*, 1999, Kramer *et al.*, 2001). Humanes (und murines) PrP besitzt vier Wiederholungen einer 8-Aminosäuresequenz (Oktapeptid), die sich zwischen der Aminosäureposition 59 und 90 befindet. Die Bedeutung dieses Sequenzmotivs erfuhr eine zusätzliche Aufmerksamkeit durch die Entdeckung, dass eine Erhöhung der Oktapeptid-Anzahl (über die des nativen PrPs hinaus) beim Menschen mit einer familiären, vererbaren Form der Prionkrankheiten assoziiert ist.

Generell bilden die familiäre CJD, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI) die Gruppe der vererbaren Formen humaner TSEs, die zusammen ca. 10 % der gesamten Erkrankungsfälle von Prionkrankheiten ausmachen. Für diese Krankheiten, die mit nahezu vollständiger Penetranz autosomal-dominant vererbt werden, konnten bislang in allen untersuchten Fällen Punktmutation oder Insertionen im Prionprotein-Gen des Menschen (*PRNP*)

verantwortlich gemacht werden. Des weiteren konnte in einigen Fällen das Hirngewebsmaterial betroffener Patienten als hochinfektiös beschrieben werden (Ferber *et al.*, 1974; Masters *et al.*, 1981; Tateishi *et al.*, 1995; Tateishi & Kitamoto, 1995). Im Rahmen der Prion-Hypothese werden die familiären Prionkrankheiten so interpretiert, dass durch die Mutationen im *PRNP*-Gen „instabilere“ Prionproteine entstehen, die mit einer geringeren Aktivierungsenergie in eine oder mehrere pathogene Formen übergehen und eine autokatalytische Kettenreaktion auslösen können. In transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Prionproteins mit zusätzlichen neun Oktapeptiden zu der Ausbildung neurologischer Störungen (Chiesa *et al.*, 1998) und dass die Expression einer GSS-assoziierten PrP-Mutante (PrP P102L) zu der spontanen Entstehung einer spongiformen Enzephalopathie führte (Hsiao *et al.*, 1989, 1990, 1994). In Zellkulturstudien konnte ebenfalls für diese beiden, aber auch für andere Mutationen in *PRNP*, die mit vererbbaaren Formen der Prionkrankheit assoziiert sind, biochemische Eigenschaften der PrP-Mutanten beschrieben werden, die charakteristisch für PrP^{Sc} sind (Rogers *et al.*, 1993; Lehmann & Harris, 1995, 1996a, 1996b, 1997; Petersen *et al.*, 1996; Daude *et al.*, 1997; Priola & Chesebro, 1998; Zanusso *et al.*, 1999). Die bislang identifizierten, Krankheits-assoziierten Mutationen befinden sich mit Ausnahme der Insertmutationen der Oktapeptidregion im zentralen und C-terminalen Bereich von PrP und führen entweder zu einzelnen Aminosäure-Austauschen oder zu Kettenabbrüchen (Windl *et al.*, 1999). Eine dieser Mutationen verursacht die Zerstörung des Erkennungsmotivs einer (der N-terminaleren) Glykosylierungsstelle im Prionprotein, so dass diese PrP-Mutante (PrP T183A) nur noch in der un- und einfach-glykosylierten Form synthetisiert wird (Rogers *et al.*, 1990; Nitrini *et al.*, 1997; Lehmann & Harris, 1997; Windl *et al.*, 1999; Finckh *et al.*, 2000).

Wie sehr sich jedoch auf zellulärer Ebene die Pathogenese sowohl innerhalb der Gruppe der vererbbaaren Formen als auch im Vergleich zu den sporadischen (mit unbekannter Ursache) und erworbenen Prionkrankheiten unterscheidet, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Studien zur Biogenese von PrP^{Sc} ermittelten als wahrscheinlichste zelluläre Stelle der Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} einen Ort, der (entlang des sekretorischen Weges von PrP) jenseits des ERs liegt (Taraboulos *et al.*, 1990, 1992; Caughey *et al.*, 1991b). Sowohl biochemische als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben als Domänen der PrP^C-Umwandlung zu PrP^{Sc} sogenannte „rafts“ bzw. Glykolipid-reiche Mikrodomänen oder CLDs („caveolae-like domains“) und

die anschließende Akkumulation von PrP^{Sc} entlang eines endocytotischen Weges sowohl in CLDs als auch in Lysosomen und „späten“ Endosomen (Caughey *et al.*, 1991b; McKinley *et al.*, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Laszlo *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992, 1995; Arnold *et al.*, 1995; Harmey *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Die Mechanismen, die letztlich für die Entstehung und anschließenden Verbreitung von PrP^{Sc} verantwortlich sind bzw. den neuropathologischen Veränderungen zugrunde liegen, konnten jedoch noch nicht beschrieben werden. Da für einige PrP-Mutanten der vererbaren Formen schon abweichende zelluläre Phänotypen gezeigt werden konnten (Lehmann & Harris, 1995, 1996a, 1996b, 1997, Zanusso *et al.*, 1999), scheint es höchst fragwürdig, ob diese Prionproteine die selben pathogenen Mechanismen wie (nicht mutiertes) PrP^{Sc} vollziehen. So konnten für zwei Krankheits-assoziierte PrP-Mutanten (PrP Y145X und PrP T183A) definiert unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen ermittelt werden, welche die Akkumulation dieser Proteine entlang eines endocytotischen Weges als sehr unwahrscheinlich erscheinen lassen (Lehmann & Harris, 1997; Zanusso *et al.*, 1999).

Da für die Mehrzahl der PrP-Mutanten, die mit einer familiären Prionkrankheit assoziiert sind, zwar biochemische Daten bezüglich ihrer PK-Resistenz und Detergenzunlöslichkeit beschrieben worden sind, jedoch nur sehr wenig über ihre Zellbiologie bekannt ist, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit PrP-Chimären mit dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP) als Markerprotein hergestellt werden (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). Die GFP-PrP-Chimäre sollte dabei nicht nur als Markerprotein einer stattfindenden bzw. nicht stattfindenden PrP-Expression dienen, sondern eine Observation des zellulären Transports von Prionproteinen in lebenden Zellen ermöglichen. Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass die Fusion von GFP mit diversen Peptidsequenzen bzw. vollständigen Proteinen zu einer definierten Lokalisation dieser Fusionsproteine in den transfizierten Zellen führte. So konnten Untersuchungen über den zellulären Transport sowohl für cytosolische oder nukleäre Proteine als auch für membranständige, sekretorische Proteine beschrieben werden (Kaether & Gerdes, 1995; Presley *et al.*, 1997; Wacker *et al.*, 1997; Jaegly *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998; Lechardeur *et al.*, 2000). Dabei konnte auch schon gezeigt werden, dass GFP in Verbindung mit Signalsequenzen (ER-Signalpeptid) und C-terminalen, hydrophoben Domänen bzw. GPI-„Ankern“ einen Transport entlang des sekretorischen Pfades vollzieht und eine GPI-„verankerte“ Lokalisation auf der Zelloberfläche aufweist (Kondoh *et al.*, 1999; Simonova *et al.*, 1999; Patankar *et al.*, 2000;

Nichols *et al.*, 2001). Ausgehend von der Einsatzmöglichkeit von GFP als Markerprotein bzw. Fusionspartner von sekretorischen Proteinen, sollte das grüne Fluoreszenzprotein als integraler Bestandteil in wt Maus-PrP inseriert werden, so dass eine GFP-wtPrP-Chimäre entsteht, die weitestgehend den bereits bekannten zellulären Eigenschaften von nativem wt PrP entspricht. Daran anschließend sollte mit dieser GFP-PrP-Chimäre ein Modellsystem zur Aufklärung des zellulären Transports bzw. der Lokalisation von PrP-Mutanten etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid (40 %; Verhältnis AA/BAA= 37,5:1)	Amresco, Ohio, USA
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Difco, Detroit, USA
APS	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
BCIP	Roche, Mannheim
BSA	Paesel & Lorei, Hanau
Desoxyribonukleotide	Promega, Heidelberg
DMSO	Sigma, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
I-Block TM	Tropix, Bedford, USA
Long Ranger TM (Acrylamid)	AT Biochem, Malvern, USA
NBT	Roche, Mannheim
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Amresco, Ohio, USA
TEMED	Amresco, Ohio, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) und Bio-Rad (München) bezogen.

2.1.2. Enzyme und Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen

Klenow-Fragment der DNA Polymerase I	Promega, Heidelberg
Doxycyclin	Sigma, Taufkirchen
Geneticin [®] (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Hygromycin B	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Seromed, Biochrom KG, Berlin
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PIPLC)	Sigma, Taufkirchen
PNGase F	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Promega, Heidelberg; New England Biolabs, Bad Schwalbach
T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg

2.1.3. „Kits“ zur Behandlung von DNA

Plasmid Midi Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.4. DNA- und Protein-„Standards“

DNA-Längenstandard

1-kb-DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
-----------------	-----------------------

Fragmentlängen (bp): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506 und 8 kleinere Fragmente.

Die DNA-Längenstandardlösung wurde mit TE-Puffer und 1 x DNA-Auftragspuffer auf eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt.

SDS-PAGE Protein-Molekularstandard

„Broad Range“, vorgefärbt

Bio-Rad, München

Der Protein-Standard lieferte folgende Molekulargrößen:

Myosin, M_r 202000; β -Galaktosidase, M_r 116000; Rinderserum Albumin, M_r 84000; Ovalbumin, M_r 50100; Carbonische Anhydrase, M_r 35700; Sojabohnen Trypsininhibitor, M_r 29300; Lysozym, M_r 21200; Aprotinin, M_r 7500

2.1.5. Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien und eukaryontischen Zellen

Einfrierröhrchen (2,0 ml) für Zellen	Nunc, Wiesbaden
(Steril-)Filter	Schleicher & Schüll, Dassel
Kulturgefäße, Plastikwaren	Sarstedt, Braunschweig; Nunc, Wiesbaden; Greiner, Solingen
Pipetten 2,5; 5 ml; 10 ml; 25 ml	Sarstedt, Braunschweig
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Sarstedt, Braunschweig; Biozym, Hess. Oldendorf
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Zellkratzer	Sarstedt, Braunschweig
Zentrifugiergefäße 15 und 50 ml	Sarstedt, Braunschweig

2.1.6. Verbrauchsmaterial für „Western blots“

PVDF-Immobilon TM -P	
Transfer-Membrane	Millipore, Molsheim
Whatman 3MM Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.7. Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA

6 x DNA-Auftragspuffer

0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin; 100 mM EDTA; pH 8,0

10 x Klenow-Puffer (Promega)

500 mM Tris/HCl; pH 7,2; 100 mM MgSO₄; 1 mM DTT

Lösung B

LB-Medium mit 12 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 36 % (v/v) Glycerin; 12 % (v/v) PEG (MW 7500); sterilfiltriert

Medium A

LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O und 0,2 % (v/v) Glucose

P1-Puffer (Qiagen)

200 mM Tris/HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA; RNase A (100 µg/ml)

P2-Puffer (Qiagen)

200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer (Qiagen)

3,0 M Kaliumacetat; pH 4,8

Phenol/TE

Phenol, mit TE-Puffer gesättigt

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

1 Vol. Phenol/TE mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

QBT-Puffer (Qiagen)

750 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15 % (v/v) Ethanol; 0,15 % Triton X-100

QC-Puffer (Qiagen)

1,0 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15 % (v/v) Ethanol

QF-Puffer (Qiagen)

1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 15 % (v/v) Ethanol

10 x TBE-Puffer

0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,025 M EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,5 mM EDTA

Tris-Puffer

Trishydroxymethylaminomethan in bidestilliertem Wasser auflösen und den pH mit Säure einstellen. Für Tris/HCl Salzsäure für Tris/Acetat Essigsäure verwenden. Der pH-Wert von Tris-Puffern kann mit gewöhnlichen Elektroden nicht genau bestimmt werden und wurde deshalb mit pH-Indikatorpapier überprüft.

2.1.8. Lösungen und Puffer für Proteinarbeiten und Arbeiten in der Zellkultur**Alkalische Phosphatase-Puffer**

100 mM Tris/HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

10 % APS

0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H₂O

BCIP-Lösung

50 mg BCIP pro ml in 100 % DMF

Blocking-Puffer

1 x PBS; 0,2 % (w/v) I-Block™ (Tropix); 0,1 % (v/v) Tween 20

Blotting-Puffer

0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % Methanol

Laufpuffer für SDS-PAGE

0,025 M Tris; pH 8,3; 0,192 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

NBT-Lösung

50 mg NBT pro ml in 70 % DMF

1 x Phosphatgepufferte Saline (PBS)

9,55 g Instamed PBS Dulbecco (Seromed, Biochrom KG, Berlin)/l bidest. H₂O

PBS(+)

PBS; 1,0 mM Ca²⁺; 0,5 mM Mg²⁺

PBS-Tween

PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20

2 x Proteinprobenpuffer

0,125 M Tris/HCl; pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,2 M DTT; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

4 x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl; pH 6,8

10 % SDS

1 g SDS in 10 ml H₂O

TNE-Puffer

50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA

4 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Zellysispuffer

TNE-Puffer; 0,2 % (w/v) Sarcosyl

2.1.9. Nährmedien für die Mikrobiologie**LB-Medium**

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; H₂O ad 1 Liter

TB-Medium

1,2 % (w/v) Trypton; 2,4 % (w/v) Hefeextrakt; 0,4 % (v/v) Glycerin; nach dem Autoklavieren Zugabe von steriler Kaliumphosphatlösung (Endkonzentration: 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄)

Die Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Danach wurde nach Bedarf das Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) dem Medium zugesetzt.

LB-Platten

LB-Medium mit zusätzlich 15 g Agar

2.1.10. Medium für eukaryontische Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

mit 1,0 g/l Glucose, ohne L-Glutamin

Bio Whittaker, Belgien

2.1.11. Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen

FCS

Seromed, Biochrom KG, Berlin;

Clontech, Palo Alto, USA

L-Glutamin (200 mM)

Seromed, Biochrom KG, Berlin

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

Bio Whittaker, Belgien

Phosphatgepufferte Saline (PBS),

Instamed PBS Dulbecco

Seromed, Biochrom KG, Berlin

Trypsin/EDTA (10 x),

(0,2 % (w/v) in PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

Seromed, Biochrom KG, Berlin

2.1.12. Zellkulturmedium

DMEM

+ 10 % (v/v) inaktiviertes FCS

+ 1 % (v/v) L-Glutamin

+ 1 % (v/v) P/S

2.1.13. *Escherichia coli*-Stämme

DH1 (Bachmann, 1987)

$\text{F}^- \text{endA1 recA1 hsdR17 (r}_k^- \text{m}_k^+) \text{supE44 thi1 gyrA96 relA1}$

GM2163 (Woodcock *et al.*, 1989)

$\text{F}^- \text{ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136 (Str}^r\text{)}$
 $\text{xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 (Cam}^r\text{) dcm-6 mcrB1 hsdR2 (r}_k^- \text{m}_k^+) \text{mcrA}$

XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987)

$\text{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F}'\text{proAB lacI}^q \Delta \text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{)]}^c$

2.1.14. Eukaryontische Zelllinien

N2a (Neuro-2a, ATCC CCL-131, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)

rN2a-tTA, Klon 26 (Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999)

rN2a-tTA, Klon 29 (Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999)

rrN2a-tTA-PrP, Klon 74 (Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999)

2.1.15. Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotide

für GFPΔ1

5'-GGTAAAGGAGAAGAAC-3'

5'-CATGGTGGCGACCGGT-3'

für PrP P101L

5'-TCAGCAAACCAAAAACC-3'

5'-GCTTGTTCCACTGATTA-3'

für PrP W144X

5'-CCATTTTGGCAACGACTAGGAGGACCGCTACTACCG-3'

5'-ATCATGGGCCTGCTCACGGCGCTCCCC-3'

für PrP Q159X

5'-GTACCGCTACCCTAACTAAGTGTACTACAGGCC-3'

5'-ATGTTTTTCACGGTAGTAGCGGTCCTCCCAGTCG-3'

für PrP D177N

5'-AACTGCGTCAATATCACC-3'

5'-GTGCACGAAGTTGTTCTG-3'

für PrP T182A

5'-GCCATCAAGCAGCAC-3'

5'-GATATTGACGCAGTCG-3'

für PrP T187K

5'-CCATCAAGCAGCACAAAGGTCACCACCACCACC-3'

5'-TGATATTGACGCAGTCGTGCACGAAG-3'

für PrP T187R

5'-GGGTCACCACCACCACCAAG-3'

5'-TGTGCTGCTTGATGGTGATATTG-3'

für PrP T198A

5'-GCCGAGACCGATGTG-3'

5'-GAAGTTCTCCCCCTT-3'

für PrP E199K

5'-AAGACCGATGTGAAGATG-3'

5'-GGTGAAGTTCTCCCCCT-3'

2.1.16. Plasmide**Tabelle 1. Vektoren**

Name	relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pBluescript® II SK (-)	Klonierungsvektor; Ap ^r	Stratagene, La Jolla, USA
pcDNA3.1	Säugerzellen-Expressionsvektor; CMV-Promotor; SV40 poly(A), Ap ^r	Invitrogen, Leed, Niederlande
pUHD 10-3	Induzierbarer Säugerzellen- Expressionsvektor; CMV- Minimalpromotor; SV40 poly(A), Ap ^r	ZMBH, AG H. Bujard, Heidelberg; Gossen & Bujard, 1992; Gossen <i>et al.</i> , 1995
pBS-Prnp	pBluescript® II SK mit Maus-PrP ORF; Mutagenesevektor, Ap ^r	Institut für Neuropathologie, München; Windl <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 2. cDNAs in Expressionsvektoren für Säugerzellen

Name	Expressionsplasmid für:	Herkunft/Referenz
pHL1	wt Maus-PrP ORF	Lorenz, 1997; Windl <i>et al.</i> , 1999
pS65T-C1	GFP-S65T	Clontech, Heidelberg
pGFP-wtPrP	GFP-wtPrP-Chimäre	diese Arbeit
pGFP-PrP P101L	GFP-wtPrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Prolin 101 zu Leucin	diese Arbeit
pGFP-PrP W144X	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Nonsense-Mutation von Tryptophan 144 zu Stop	diese Arbeit
pGFP-PrP Q159X	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Nonsense-Mutation von Glutamin 159 zu Stop	diese Arbeit
pGFP-PrP D177N	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Asparaginsäure 177 zu Asparagin	diese Arbeit
pGFP-PrP T187K	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Threonin 187 zu Lysin	diese Arbeit
pGFP-PrP T187R	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Threonin 187 zu Arginin	diese Arbeit
pGFP-PrP T182A	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Threonin 182 zu Alanin	diese Arbeit
pGFP-PrP T198A	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Threonin 198 zu Alanin	diese Arbeit
pGFP-PrP T182A/T198A	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutationen von Threonin 182 und 198 zu Alanin	diese Arbeit
pGFP-PrP E199K	GFP-PrP-Chimäre mit PrP-Mutation von Glutaminsäure 199 zu Lysin	diese Arbeit
pGFP-mhPrP	GFP-Maus/Mensch-wtPrP-Chimäre	diese Arbeit
pGFP-mhPrP+5Op	GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimäre mit Insertion von 5 weiteren PrP-Oktapeptiden	diese Arbeit
pGFP-mhPrP+6Op	GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimäre mit Insertion von 6 weiteren PrP-Oktapeptiden	diese Arbeit
pGFP-mhPrP+9Op	GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimäre mit Insertion von 9 weiteren PrP-Oktapeptiden	diese Arbeit

2.1.17. Immunologische Detektion

Folgende Antikörper wurden für immunologische Detektionen in der angegebenen Verdünnung in der „Western blot“- bzw. Immunfluoreszenzanalyse** eingesetzt:

Tabelle 3. Antikörper

Bezeichnung	Spezifikation	Verdünnung	Herkunft/Referenz
anti-PrP-Antikörper			
Kan72	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (Wb)* 1:200 (IF)**	Hölscher <i>et al.</i> , 1998
6H4	Maus, monoklonal	1:2000 (Wb)	Prionics AG, Basel, Schweiz
3F4	Maus, monoklonal	1:10000 (Wb)	Kascsak <i>et al.</i> , 1987
anti-GFP-Antikörper			
anti-GFP, polyklonal	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (Wb)	Clontech, Heidelberg
anti-GFP, monoklonal	Maus, monoklonal	1:500 (Wb)	Clontech, Heidelberg
anti-Golgi-Antikörper			
anti-58K Protein	Maus, monoklonal	1:50 (IF)	Sigma, Taufkirchen
Sekundär-Antikörper			
anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000 (Wb)	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000 (Wb)	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG, Texas Red-gekoppelt	Kaninchen, polyklonal	1:50 (IF)	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG, TRITC-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:50 (IF)	Dianova, Hamburg

2.2. Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ von Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

2.2.1 Lagerung von Bakterienstämmen

Häufig verwendete Bakterienstämme wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen gelagert.

2.2.2. Stammhaltung von *E. coli*-Kulturen

Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden jeweils 0,9 ml einer Übernachtskultur mit 0,1 ml Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.3. Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung

E. coli wurde aerob in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180-250 rpm angezogen. Bei der Verwendung von LB-Medium wurde über Nacht und bei der Verwendung von TB-Medium für 6-8 Stunden inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung (Ultrospec II, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Medium verfolgt.

2.2.4. Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen (Nishimura *et al.*, 1990)

50 ml Medium A wurden mit 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Phase ($OD_{600} \approx 0,4-0,6$) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gestellt, anschließend

bei 4000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden danach mit 0,5 ml vorgekühltem Medium A resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 ml Lösung B gut gemischt. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 0,1 ml aufgeteilt und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

2.2.5. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der jeweiligen DNA (ca. 100 pg) gemischt und für 15 bis 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie einem Hitzeschock bei 42°C für 60 s ausgesetzt, für 1-2 min auf Eis gestellt und dann mit 0,9 ml LB-Medium (RT) versetzt. Zur Expression der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert („Kur“) und daraufhin in geeigneten Volumina (i. d. R. 100-200 µl) auf Selektivplatten ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.6. Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

2.2.6.1. Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung von DNA und der teilweisen Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Dabei wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, welches, durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante, die Abstoßung der negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats vermindert, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wird.

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat- oder 7 M NH₄-Acetat-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde mit 2-3 Vol. Ethanol versetzt und gründlich gemischt. Die Präzipitation erfolgte für 30 min bei -80°C oder 60 min bis über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) pelletiert, anschließend einmal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, RT). Das DNA-Präzipitat wurde im Exsikkator oder bei RT getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.2.6.2. Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontaminationen diente die Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gründlich gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 5 min zentrifugiert (14000 rpm, RT). Die DNA in der wässrigen Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei Bedarf einer Fällung mit Ethanol unterzogen.

2.2.6.3. Konzentrationsbestimmung der DNA

10 µl der DNA-Lösungen wurden auf 0,5 ml mit H₂O aufgefüllt und die Konzentrationen durch Messung der OD₂₆₀ in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen 0,5 ml H₂O bestimmt. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml.

Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde als Maß für die Reinheit der DNA herangezogen. Für sehr reine DNA-Lösungen beträgt das Verhältnis 1,8 bis 1,95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen und Verunreinigungen mit Phenol.

Geringe DNA-Mengen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel über ihre Fluoreszenzintensität unter UV-Licht durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration bestimmt.

2.2.6.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes so gewählt, dass die Enzym-Stammlösung wenigstens 1:10 verdünnt wurde, um unspezifische Reaktionen aufgrund zu hoher Glycerinkonzentrationen zu vermeiden. Pro µg DNA wurden etwa 1-2 Einheiten (Units) des Enzyms und 0,1 Vol. des entsprechenden 10fach Restriktionspuffers zugegeben. Die Inkubation erfolgte i. d. R. bei 37°C für eine bis mehrere Stunden. Die Spaltung wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.7. Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.7.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

3 ml LB-Selektionsmedium (LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem Plasmid-tragenden *E. coli*-Stamm beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, RT) von 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurde das Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes in 150 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Lyse durch Zugabe von 150 µl P2-Puffer. Das Lysat wurde mehrmals geschüttelt, mit 150 µl eiskaltem P3-Puffer neutralisiert und mindestens 5 Minuten auf Eis belassen. Nach einer Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, 4°C) wurde die DNA im Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und einer Fällung mit Ethanol unterzogen.

2.2.7.2. Midipräparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)

30-40 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 0,5 ml Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Kultur wurde im JA-17-Röhrchen für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 4 ml P2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 4 ml eiskaltem P3-Puffer neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 30 min bei 16000 rpm zentrifugiert (4°C), der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen und auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem JA-17-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (15 min auf Eis) und bei 16000 rpm bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen. Abschließend wurde die DNA-Konzentration durch eine OD₂₆₀-Messung bestimmt und Aliquots zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX[®] II-Kit (Qiagen, Hilden) angewendet. Es wurden die beigelegten Puffer verwendet und die Extraktion anhand des mitgelieferten Protokolls wie folgt durchgeführt. Die DNA-Bande wurde über dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Etwa 3 Vol. Puffer QX1 wurden auf das Gelstück gegeben und in Abhängigkeit von der DNA-Menge verschiedene Volumina der gründlich gemischten QIAEX II-Suspension (10 µl bei ≤ 2 µg DNA, 30 µl bei 2-10 µg DNA) zugefügt. Der Ansatz wurde 10 min bei 50°C inkubiert und dabei alle 2 min kurz gemischt (Vortexgerät) um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension zu gewährleisten. Nach einer Zentrifugation (30 s, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit Puffer QX1 und zweimal mit Puffer PE gewaschen (jeweils 500 µl Puffer, resuspendieren mittels Mischen am Vortexgerät und zentrifugieren für 30 s bei 14000 rpm und RT). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und zur Elution der DNA in 20 µl H₂O resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min bei der jeweils empfohlenen Temperatur (DNA-Fragmente ≤ 4 kb bei RT, DNA-Fragment 4-10 kb bei 50°C) wurde die Suspension zentrifugiert (30 s, 14000 rpm, RT), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Elution mit 10 µl H₂O wiederholt und die DNA-Lösungen vereinigt. Qualität und Konzentration der eluierten DNA wurden im Agarosegel überprüft.

2.2.8. Agarosegelelektrophorese

Für die präparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7 bis 1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nach dem Kochen der Agarose in 0,5 x TBE-Puffer wurde 1/2000 Vol. einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) zugesetzt, die Agarose in eine Flachbettschale gegossen und mit einem Kamm versehen, welcher für die Ausbildung der Probenauftragstaschen sorgte. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Flachbettelektrophoresekammer überführt und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 0,1-0,2 Vol. 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Längenstandard diente die 1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein). Für die Elektrophorese wurden Spannungen von bis zu 120 Volt (Feldstärken

5-15 V/cm) angelegt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.9. Präparation von DNA für die Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut und entweder mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder mittels des QIAEX[®] II-Kits (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.2.9.1. Auffüllen von 3'-zurückliegenden DNA-Enden

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit verschiedenen 5'-überhängenden Enden (*sticky ends*) wurden die 3'-zurückliegenden Stränge durch die entsprechenden Desoxynukleosid-5'-triphosphate aufgefüllt, so dass doppelsträngige, stumpfe Enden (*blunt ends*) entstanden. Diese Reaktion wird durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* katalysiert, welches im Gegensatz zum gesamten Enzym nur die 5', 3'-Polymerase- und die 3', 5'-Exonukleaseaktivität aufweist.

Nach der Restriktionsspaltung für 2-3 Stunden wurden die Endonukleasen durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert und anschließend 2 µl Klenow-Fragment (5 U/µl), 4 µl 10 x Klenow-Puffer und 3 µl dNTP (je 25 mM) zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37°C für 45 min wurde der Ansatz auf ein präparatives Gel geladen und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel isoliert.

2.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Verknüpfungsreaktion erfolgte unter Einsatz der T4-DNA-Ligase, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende von DNA-Molekülen katalysiert.

Reaktionsmix:

Vektor-DNA nach Restriktionsverdau (50-200 ng)

DNA-Fragment (5-10facher molarer Überschuss)

1 x T4-DNA-Ligase-Puffer

T4-DNA-Ligase (1-2 U)

i. d. R. H₂O ad 10 µl

Die Reaktionen wurden entweder bei 37°C für 3 Stunden oder bei RT über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden *E. coli*-Zellen mit der DNA der Ligationsansätze transformiert, eine Minipräparation von den auf Selektivplatten gewachsenen Kolonien durchgeführt und die Konstrukte durch Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzanalyse überprüft.

2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR (Mullis & Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1988) wurden i. d. R. mit einem Volumen von 50 µl in 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym, Hess. Oldendorf) in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen; Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Um einen Fehleinbau von Nukleotiden bei der Enzymreaktion weitestgehend zu vermeiden wurde *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, die eine deutlich bessere Fehlerkorrekturrate aufweist als z.B. *Taq*-DNA-Polymerase. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

DNA	50-500	ng
„Primer“	je 50	pmol
dNTP-Gemisch (je 10 mM)	1	µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (Stratagene)	1	U
10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (Stratagene)	5	µl
H ₂ O	ad 50	µl

Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze mit sterilem Mineralöl (Sigma, Taufkirchen) überschichtet. Die Denaturierung erfolgte im ersten Zyklus bei 94°C für 2 min, danach bei jedem Zyklus bei 94°C für 1 min. Die Anlagerungstemperatur wurde

ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur der „Primer“ empirisch optimiert und die Kettenverlängerung erfolgte jeweils bei 72°C für 2,5 min/kb. Nach Abschluss von 20-25 Temperaturzyklen wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für ihre Weiterverwendung präpariert.

2.2.12. DNA-Sequenzanalyse

2.2.12.1. „Cycle sequencing“-Reaktionen

DNA-Sequenzierungen wurden an einem „Li-Cor“ DNA-Sequenzierer (MWG Biotech, Ebersberg) mit Hilfe des „Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg) und Fluoreszenzfarbstoff-(IRD-800)-markierter „Primer“-Moleküle (MWG Biotech, Ebersberg) vorgenommen. Das Verfahren stellt eine Modifikation der Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) dar und beinhaltet die Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen in zyklischen Sequenzierreaktionen („cycle sequencing“-Reaktionen).

Zur Herstellung des „DNA/Primer Premix“ wurden folgende Komponenten in einem 500 µl-PCR-Reaktionsgefäß (Biozym, Hess. Oldendorf) gemischt:

DNA	100	ng/kb
„Primer“ (IRD-800 markiert)	2	pmol
DMSO	1	µl
H ₂ O	ad 25	µl

Je 2 µl „G-, A-, T- und C-termination-mix“ (enthalten thermostabile Polymerase und Reaktionspuffer) wurden in vier 500 µl-PCR-Reaktionsgefäße gegeben, mit je 6 µl des „DNA/Primer Premix“ gemischt und mit 1 Tropfen sterilem Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktionen wurden anschließend in einer PCR-Maschine (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Standard-Temperaturzyklen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 25x
„Primer“-Anlagerung		30 s	
Polymerisierung	70°C	30 s	

Nach Beendigung der Zyklen wurden 8 µl „stop solution“ in jedes Reaktionsgefäß gegeben und je 2 µl der Reaktion auf das Sequenziergel geladen.

2.2.12.2. Das Sequenzgel

Zur Analyse der Sequenzierreaktionen dienten 0,25 mm starke, 4,3 %ige (w/v) Polyacrylamid-Gele (Sanger & Coulson, 1978) mit einer Trennstrecke von 41 cm, die mit Hilfe des „Long Ranger™“ Fertig-Acrylamid-Systems (Biozym, Hess. Oldendorf) und der zum „Li-Cor“-System gehörenden Gelgießausrüstung hergestellt wurden. Nachdem die Rücken- und Abdeckglasplatte gründlich gereinigt waren, wurden der Gelstand aufgebaut und die fertige Gellösung vorsichtig entlang des oberen Randes der Abdeckplatte aufgetragen. Anschließend wurde der Kamm mit der glatten Seite zum Gel in die dafür vorgesehene Aussparung der Abdeckplatte eingesetzt und das Gel zum Auspolymerisieren für 1 h waagrecht gelagert. Nachdem das Gel gemäß den Herstelleranweisungen in den Sequenzierapparat eingebaut und die Pufferkammern mit 1 x TBE gefüllt worden waren, wurde der Kamm umgedreht und mit der gezähnten Seite zum Gel so wieder eingesetzt, dass die Zähne leicht auf der Geloberfläche wieder aufsaßen. Nach einem Vorlauf von ca. 30 min wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese bei 2200 V, 37 mA und 45°C durchgeführt. Die während des Laufs aufgezeichneten Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des im „Li-Cor“-System enthaltenen Programms „Base ImagIR“ Version 2.30 ausgewertet.

Gellösung für Sequenziergele:

Harnstoff	21	g
10 x TBE	5	ml
“Long Ranger™“	4,3	ml
TEMED	50	μl
10 % (w/v) APS	250	μl
H ₂ O	ad 50	ml

2.3. Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen und für Proteinarbeiten

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, den Laborhandbüchern „Antibodies“ von Harlow & Lane (1988) und „Cells“ von Spector *et al.* (1998) entnommen.

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 10 % CO₂ und 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37°C vorgewärmt und alle Arbeiten mit sterilem Plastikmaterial (Pipetten, Gewebekulturschalen, -flaschen und -platten) durchgeführt.

2.3.1. Trypsinieren von Zellen

Das Medium wurde von der Gewebekulturschale, -flasche oder -platte gründlich entfernt und die Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte, der Aufbewahrungsdauer der Zellkultur und dem Zelltyp in einem empirisch ermittelten Volumen Trypsin/EDTA für bis zu 5 min bei 37°C inkubiert. Das durch die Protease Trypsin verursachte Abrunden und somit Ablösen der Zellen konnte währenddessen sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch kontrolliert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und bei

Bedarf die Zellzahl pro ml mit Hilfe des Hämocytometers (Zählkammer nach Neubauer) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät bzw. für das Einfrieren präpariert.

2.3.2. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in eine 80 cm²-Gewebekulturflasche passagiert und beim Erreichen einer 60-90 %igen Konfluenz zum Einfrieren präpariert. Aufgeteilt wurden die Zellen solch einer Flasche in 2 bis 3 Einfrierröhrchen (jeweils 0,8 ml Einfriermedium).

Nach der Trypsinierung wurden die Zellen pelletiert (5min, 1000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und in 0,4 ml eiskaltem Medium 1 (80 % DMEM, 20 % FCS) resuspendiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt, die mit 0,4 ml eiskaltem Medium 2 (60 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO) aufgefüllt vorlagen und durch mehrfaches Umdrehen vermischt. Die Röhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten Isopropanoltank langsam auf -80°C (-1°C/min) abgekühlt und anschließend in Stickstoff gelagert.

2.3.3. Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Das Einfrierröhrchen wurde nach der Entnahme aus dem Stickstofftank zum vollständigen Auftauen der Zellen in ein 37°C-Wasserbad überführt. Anschließend wurde das Röhrchen kurz in ein alkoholgetränktes Papiertuch gehüllt und die Zellsuspension unter der Sterilbank in 9 ml Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden daraufhin in der Minifuge pelletiert (5 min, 1000 rpm, RT), in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

2.3.4. Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Für alle Transfektionen wurde die DNA durch Midipräparationen von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode) gewonnen und bei vergleichenden Tests ausschließlich DNA gleicher Konzentration und Güte verwendet, um möglichen Qualitätsschwankungen entgegenzutreten. Die für Transfektionen in die geeigneten Gewebekulturschalen zu passagierenden Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase, d. h. sie wiesen eine Konfluenz von 60-80 % auf. Als Transfektionsreagenz wurde „Effectene“ (Qiagen, Hilden) verwendet und das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll für die Transfektion von adhärenenten Zellen durchgeführt. Dabei wurde unter definierten Bedingungen die DNA mit den Komponenten des „Effectene“-Kits in Zellkulturmedium vermischt und auf die Zellen aufgetragen. Die Zellen wurden mind. 8 h mit diesem Transfektionsansatz inkubiert und anschließend in frischem Zellkulturmedium kultiviert.

2.3.5. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Analyse von Fluoreszenzsignalen bei eukaryontischen Zellen wurde mit konfokalen Laserscanning-Mikroskopiern von Leica (Leica TCS NT/SP2 confocal systems, Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurden das Wasserimmersionsobjektiv Achroplan 63x/0,90 NA und das Ölimmersionsobjektiv Fluar 40x/1,3 NA (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Argonionen-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und die rot emittierenden Farbstoffe (Alexa 594, Texas Red, TRITC) mit einem HeNe-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm unter Verwendung von FITC- bzw. TRITC-Filtereinstellungen angeregt. Das System wurde so eingestellt, dass die Schichtdicke einer Aufnahme niemals 1,5 µm überschritt (i. d. R. 1 mal „airy disc“) und bei vergleichenden Studien wurden identische Einstellungen verwendet. Lebende (nicht fixierte) Zellen wurden für Aufnahmen über einen längeren Zeitraum bzw. bei der Beobachtung von Reaktionsabläufen bei 37°C (Wärmeplatte) und kontrollierten Gasbedingungen gehalten. Für kurzfristige Aufnahmen (bis max. 10 min) wurden die Zellen entweder in Zellkulturmedium oder PBS(+) bei RT gehalten. So genannte „bleaching“-Experimente (White & Stelzer, 1999) wurden durch das Bestrahlen eines

definierten Zellbereiches mit hoher Laserintensität (ca. 3-5mal höher als die gewöhnliche Aufnahmeintensität) über einen Zeitraum von 10-12 s (xyt-Modus, $\Delta t = 1$ s) durchgeführt. Zur Verifizierung der, mittels konfokaler Mikroskopie, gewonnenen Eindrücke über die qualitative und quantitative Verteilung von Fluoreszenzsignalen wurden pro Konstrukt mehrere Dutzend transfizierter Zellen betrachtet und stets serielle Aufnahmen durch die Zellen aufgenommen, um einen objektiveren Eindruck zu gewinnen. Die erhobenen Daten wurden von der zum System gehörenden Leica Software und dem Computerprogramm „Adobe Photoshop“ (Adobe) bearbeitet.

2.3.6. Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Adhärenente Zellen wurden in PBS(+) mehrfach gewaschen und für die Fixierung mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend entweder für die Markierung von Zellorganellen mit Fluoreszenzfarbstoffen bzw. für die Immunfluoreszenz weiterverwendet oder sogleich in einem „Fluorescent Mounting“-Medium (Dako, Hamburg) konserviert. Falls notwendig für die weitere Markierung, wurden die Zellen nach der Fixierung mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 2 min bei RT permeabilisiert und über 5 min 5 mal in PBS gewaschen.

2.3.7. Immunfluoreszenzanalyse

Die Ermittlung der zellulären Lokalisation von Proteinen erfolgte durch Immunfluoreszenzanalysen. Dazu wurden fixierte und permeabilisierte Zellen mit einem für das zu analysierende Protein spezifischen Antikörper inkubiert und dessen Aufenthaltsort unter Verwendung eines zweiten, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG-Antikörpers unter einem konfokalen Mikroskop detektiert.

Transfizierte Zellen wurden zunächst mindestens 24 h auf Objektträgern („coverslips“) kultiviert bevor sie fixiert und permeabilisiert wurden. Der erste Antikörper wurde je nach Sensitivität 1:50 bis 1:200 in PBS, 3 % (w/v) BSA angesetzt und die Zellen für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal über 5 min in PBS, 1 %

(v/v) Triton X-100 gewaschen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper (1:50) in PBS, 3 % (w/v) BSA für mindestens 20 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in PBS und die Konservierung der Zellen mit Hilfe des „Fluorescent Mounting“-Einbettmediums (Dako, Hamburg) auf Objektträgern. Die Präparate konnten anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert werden.

2.3.8. Markierung von zellulären Bestandteilen und Zellorganellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Neben der Immunfluoreszenzanalyse erfolgte die zelluläre Lokalisationsbestimmung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Reagenzien, die spezifisch mit ihren zellulären Zielorganellen reagieren. Für die Markierung des Endoplasmatischen Reticulums (ER) wurde das Reagenz „Concanavalin A, Alexa 594“ (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen) und für den Golgi-Apparat „BODIPY TR ceramide“ (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen) verwendet. Die ER-Markierung erfolgte durch Inkubation fixierter Zellen mit 1-5 µg/ml Concanavalin A, Alexa 594 in PBS für 30-60 min bei RT in einer abgedunkelten Kammer. Die Anfärbung des Golgi-Apparats geschah durch die Inkubation lebender Zellen mit 1-2 µM „BODIPY TR ceramide“ in Zellkulturmedium für 20 min bis 1 h im Brutschrank. Im Anschluss an die Anfärbungen der Organelle wurden die Zellen mehrmals in PBS gewaschen und für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie präpariert.

2.3.9. Enzymatische Abtrennung GPI-verankerter Proteine von der Zellmembran

Proteine, die über ein Phosphatidylinositolglykolipid (GPI) auf der Membran „verankert“ sind, können mittels der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC) von der Zelloberfläche abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen mehrmals in HBSS gewaschen und mit 1 U/ml PIPLC (Sigma, Taufkirchen) in serumfreien Zellkulturmedium bei 37°C für 1 h im Brutschrank bzw. unter identischen Bedingungen (37°C, 10 % CO₂) unter dem Mikroskop inkubiert. Die Proteine im Inkubationsmedium wurden für die „Western blot“-Analyse anschließend Methanol-präzipitiert und für die SDS-PAGE präpariert.

2.3.10. Zellyse und Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und, nachdem der Puffer gründlich abgesaugt war, auf Eis gestellt und für ca. 20 min in Zelllysispuffer inkubiert (60 mm-Schale 300 µl, 80 cm²-Flasche 1 ml). Anschließend wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellkratzers versammelt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß transferiert. Der Lysisansatz wurde ca. 10 s gemischt (Vortexgerät) und sonifiziert (ca. 15 s, maximale Leistung). Nach einer Zentrifugation (2 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, ein Teil für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen und der Rest zur weiteren Verwendung („Western blot“) präpariert bzw. bei -80°C eingefroren.

2.3.11. Deglykosylierung von Glykoproteinen

Die von der Amidase PNGase F katalysierte Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung zwischen dem innersten *N*-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest von Glykoproteinen wurde genutzt um diese Proteine auf eine einheitliche, ihre unglykosylierte Größe zu reduzieren. Dazu wurden Puffer und Enzym eines PNGase F-Kits (New England Biolabs, Bad Schwalbach) verwendet. Es wurden 100-150 µg Gesamtprotein in 1 x „Denaturing Buffer“ für 10 min bei 99°C denaturiert und anschließend 1/10 Vol. von „10 x G7 Buffer“ und „10 % NP-40“ hinzugefügt und vermischt. Die Deglykosylierung der Glykoproteine erfolgte daraufhin mit 500 U PNGase F für mind. 1 h bei 37°C.

2.3.12. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten wurde mit Hilfe des „Bicinchoninic acid protein assay kit“ (Sigma, Taufkirchen) durchgeführt. Dabei wurden die zu untersuchenden Lysate einer Lösung, bestehend aus einer 4 %igen Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat- und einer bicinchoninischen Säure-Lösung (im Verhältnis 1:50), zugesetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch (Ultrospec II, Pharmacia) ermittelt. Die Proteinkonzentrationen konnten

anschließend anhand einer Standardkurve mit definierten BSA-Konzentrationen errechnet werden.

Für eine weniger genaue aber schnellere Konzentrationsbestimmung wurden die Extrakte bei einer OD von 280 nm spektrophotometrisch bestimmt (Ultrospec II, Pharmacia). Ein OD₂₈₀-Wert von 1 entsprach einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

2.3.13. Konzentrierung der Proteinextrakte

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das, der gewünschten Menge entsprechende, Volumen des Proteinextrakts mit mind. 4 Vol. eiskaltem Methanol vermischt und für ca. eine Stunde bei -80°C bzw. über Nacht bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Proteinpellet für 10-30 Minuten auf einen Wärmeblock (30°C) gestellt, so dass Reste von Methanol evaporieren konnten. Anschließend wurde das Pellet in Zellysispuffer und 2 x Proteinprobenpuffer (v/v im Verhältnis 1:1) aufgenommen, 30 s gemischt (Vortexgerät) und 5-10 min bei 99°C im Thermoblock gekocht. Der Ansatz wurde daraufhin für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.3.14. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).

Das Gel bestand zu etwa ¼ seiner Länge aus dem Sammelgel und zu ¾ aus dem Trenngel, welches einen 12,5 %igen Acrylamid-Anteil enthielt. Um eine bessere Auftrennung bei Proteinen über 40 kDa zu erreichen wurden neben den Minigelen (100 x 80 x 0,75 mm; Bio-Rad, München) auch größere Gele (200 x 200 x 2 mm, Bio-Rad, München) verwendet.

Gelzusammensetzung der SDS-PAGE:**Trenngel (12,5 %)**

Acrylamid-Fertiglösung (Amresco)	3,13	(9,4) *	ml
4 x Trenngelpuffer	2,5	(7,5)	ml
10 % SDS	0,1	(0,3)	ml
10 % APS	50	(150)	µl
TEMED	4	(10)	µl
H ₂ O	4,3	(12,7)	ml

Sammelgel (5 %)

Acrylamid-Fertiglösung (Amresco)	0,5	(2)	ml
4 x Sammelgelpuffer	0,9	(5)	ml
10 % SDS	20	(200)	µl
10 % APS	20	(100)	µl
TEMED	10	(10)	µl
H ₂ O	4	(12,7)	ml

*Die Werte für große Gele stehen in Klammern.

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Gellösung mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erzeugen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung zugegeben und der Kamm positioniert. Die Proteinproben wurde mit Proteinprobenpuffer versetzt, 5-10 Minuten in kochendem Wasser oder bei 99°C auf einem Thermoheizblock denaturiert und zusammen mit dem vorgefärbten SDS-PAGE Protein-Molekularstandard „Broad Range“ (Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer für SDS-PAGE bei einer Stromstärke von 20 mA pro Minigel bzw. 88 mA bei einem großem Gel.

2.3.15. Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine („Western blot“)

Für immunochemische Nachweise wurden Proteine nach ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen über Elektroelution mit Hilfe des „semi-dry“-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979; Kyhse-Andersen, 1984; Towbin & Gordon, 1984; Bjerrum & Nielsen, 1986) auf immobilisierende Membranen übertragen.

Die Proteine wurden auf PVDF-Immobilon™-P Transfer-Membrane (Millipore) transferiert. Dazu wurden auf einen Stapel aus 3, mit Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren (Whatmann 3MM) die Membran und das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und mit weiteren 3, ebenfalls mit Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Der gesamte Stapel wurde so zwischen die Elektrodenplatten einer Blot-Apparatur positioniert, dass die PVDF-Membran in Richtung Anode lag. Der Transfer wurde für 1-2 Stunden bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche durchgeführt. Nach dem „Western blotting“ wurde die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen in einer Glasküvette einmal in PBS gewaschen und anschließend für 30-60 min bei RT bis über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen gelagert. Anschließend wurde der Primär-Antikörper wie oben angegeben (s. 2.1.17) in Blocking-Puffer verdünnt und die Membran für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde 2 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen und für 30-60 min bei RT mit der Sekundär-Antikörperlösung (s. 2.1.17) inkubiert und erneut 3 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen. Die Blotmembran wurde einmal für eine Minute in Alkalische Phosphatase-Puffer gewaschen und die Katalyse der Farbreaktion in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer bei RT durchgeführt. Als Substrat wurden 66 µl NBT- und 33 µl BCIP-Lösung zugegeben und vermischt. Die Reaktion wurde bei Erreichen einer adäquaten Proteinbandenintensität nach 5-30 min mit bidestilliertem Wasser abgestoppt. Abschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet und mittels eines handelsüblichen Flachbettscanners am PC aufgenommen bzw. in Klarsichtfolie eingeschweißt und im Dunkeln aufbewahrt.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Modellsystems zur Überprüfung des zellulären Transports von Prionproteinen in lebenden Zellen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Herstellung einer Proteinchimäre die als integralen Bestandteil des Prionproteins das grüne Fluoreszenzprotein trägt um eine exakte Lokalisationsbestimmung von Prionproteinen in lebenden Zellen mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie zu ermöglichen.

3.1.1 Konstruktion einer PrP-Chimäre mit dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP)

Für die Insertion von GFP wurde die einzige *SmaI*-Stelle in *Prnp* ausgewählt, so dass GFP zwischen Aminosäure 39 und 40 im aminoterminalen Bereich von PrP vorlag. Es wurde die GFP-S65T Mutante verwendet, deren Methionin an Position 1 deletiert wurde um eine möglicherweise störende Wirkung dieses Startcodons bei der Proteinbiosynthese der Chimäre auszuschließen.

Als Ausgangsvektoren für die Herstellung des Expressionsvektors mit dem GFP-PrP-Konstrukt (schematisch dargestellt in Abb. 1) dienten pS65T-C1, pBs-Prnp und pHL1 (s. 2.1.16). Zunächst wurde pS65T-C1 mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* gespalten und die entstandenen überhängenden Enden („sticky ends“) mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I (Klenow in Abb. 1, s. 2.2.9.1) aufgefüllt. Es folgte eine Restriktionsspaltung mit *PstI*, so dass 18 Nukleotide (ohne Stopcodon-Sequenzen!) nach dem letzten codierenden Codon von GFP in pS65T-C1 eine Insertionsstelle mit einem glatten („blunt end“) und einem überhängenden Ende entstand. Dort hinein konnte dann das *Prnp*-Fragment eines *SmaI/PstI*-gespaltenen pBs-Prnp-Vektors ligiert werden. Der resultierende Vektor (pS65T-PrP40-254) wurde anschließend einer *Pfu*-PCR (s. 2.2.11) mit den Oligodesoxyribonukleotiden („Primer“) für GFPΔ1 (s. 2.1.15) unterzogen und das PCR-Produkt mit *PstI* gespalten, so dass ein Fragment entstand, welches der DNA von GFP (ohne Startcodon) und dem codierenden Bereich für die Aminosäuren 40-254 von Maus-PrP entsprach. Dieses Fragment, mit einem glatten 5'-Ende und einem überhängenden 3'-Ende wurde in den mit *SmaI* und *PstI* gespaltenen Vektor pBs-Prnp

(pBs-Prnp *SmaI/PstI*-Vektorfragment in Abb. 1) ligiert, so dass das erwünschte Konstrukt mit der GFP-DNA in der *SmaI*-Stelle von *Prnp* ohne Unterbrechung des Leserasters entstand (pBs-GFP-wtPrP). Über *PflMI* und *BamHI* wurde das GFP-wtPrP-Konstrukt in den induzierbaren Expressionsvektor pHL1 (s. 2.1.16) umkloniert und das nach der Verifizierung durch eine Sequenzanalyse (s. 2.2.12) so genannte Plasmid pGFP-wtPrP für Transfektionen von Neuroblastomzellen eingesetzt.

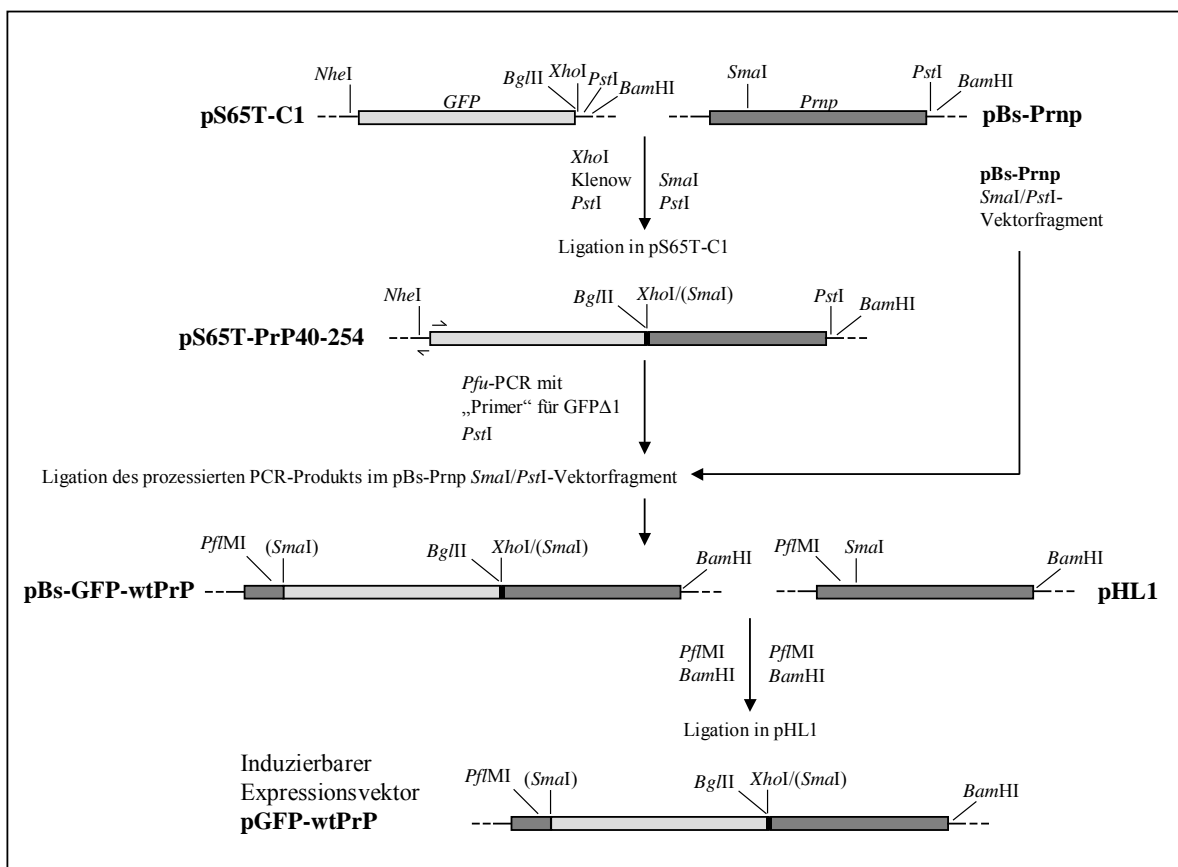


Abb. 1: Konstruktionsschema des induzierbaren Expressionsvektors pGFP-wtPrP

Aufgeführt sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen für die Herstellung der pGFP-PrP-Konstrukte. Erkennungssequenzen, die durch die Klonierung verloren gingen, sind in Klammern gesetzt. Die GFP-DNA wird als hellgraue und die PrP-DNA als dunkelgraue Balken dargestellt. Die klonierungsbedingt eingefügten 6 Aminosäuren zwischen GFP und PrP wurden schwarz dargestellt.

Zur Überprüfung der GFP-PrP-Chimäre wurden weitere Expressionsvektoren mit GFP-PrP-Kontroll-Fusionskonstrukten hergestellt, denen entweder der PrP-Teil 5' (GFP-PrPΔN) bzw. 3' (GFP-PrPΔC) von der GFP-DNA fehlten (s. Abb. 2). Damit sollte überprüft werden, ob auch ohne die komplette genetische Information von PrP bei den Kontroll-Fusionsproteinen nicht voneinander unterscheidbare zelluläre Lokalisationen im Vergleich zur GFP-wtPrP-Chimäre entstehen können, welche die exklusive Vergleichbarkeit von GFP-wtPrP zu nativem wt PrP deutlich in Frage stellen würden.

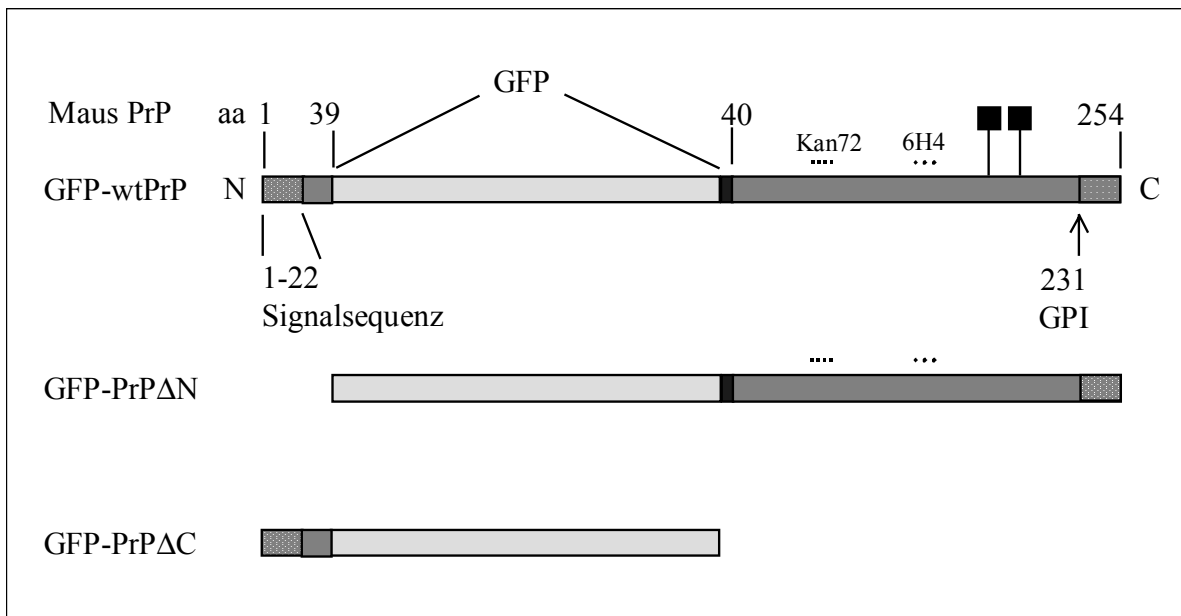


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinchimäre GFP-wtPrP und der Fusionsproteine GFP-PrPΔN und GFP-PrPΔC

Die Zahlen entsprechen den Positionen der Aminosäuren von Maus-PrP. Die ↑-Symbole zeigen die N-Glykosylierungsstellen und die gepunkteten Linien die Epitope der anti-PrP Antikörper Kan72 und 6H4 an. Sowohl die N-terminale Signalsequenz als auch die Anheftungsstelle des Glykolipid-„Ankers“ (GPI) sind dargestellt.

Zur Herstellung von pGFP-PrPΔN wurde der Vektor pS65T-PrP40-254 zunächst einmal mit *NheI* gespalten (s. Abb. 1) und die überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (s. 2.2.9.1) aufgefüllt. Daraufhin wurde eine Restriktionsspaltung mit *BamHI* durchgeführt, so dass ein Fragment entstand, welches der kompletten GFP-DNA (mit Startcodon) gefolgt von der PrP-DNA Codon 40-254 entsprach. Dieses

Fragment wurde in die MCS des Expressionsvektors pUHD10-3 kloniert, der vorher mit den Enzymen *EcoRI*, Klenow-Fragment und *BamHI* in der angegebenen Reihenfolge behandelt wurde. Bei dem entstandenen Vektor pGFP-PrP Δ N handelte es sich somit ebenfalls wie bei pGFP-wtPrP und den weiteren Kontrollkonstrukten um einen induzierbare Expressionsvektoren.

Die Vektoren pGFP-wtPrP und pGFP-PrP Δ N wurden für die Herstellung weiterer Kontrollkonstrukte verwendet. Beide wurden mit den Restriktionsendonukleasen *BglII* und *BamHI* (s. Abb. 1, jeweils einzige Spaltstellen) gespalten, welche komplementäre überhängende Enden erzeugten. Nach Abtrennung des kleinen Fragments, das die PrP spezifischen Sequenzen von Codon 40-254 enthielt, wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (s. 2.2.10) religiert. Auf diese Weise konnte die komplette PrP-DNA, die sich innerhalb der Chimäre 3' von der GFP-DNA befand, abgetrennt werden, so dass die induzierbaren Expressionsvektoren pGFP-PrP Δ C (aus pGFP-wtPrP) und pGFPS65T (aus pGFP-PrP Δ N) entstanden, die ihren Ausgangsvektoren bis auf das deletierte *BglII/BamHI*-Fragment entsprachen. Alle Konstrukte wurden, bevor sie für Transfektionen von Zellen bzw. für weitere Klonierungen eingesetzt wurden, mittels Sequenzanalyse (s. 2.2.12) überprüft.

3.2. Charakterisierung der GFP-PrP-Expression: Die biochemische und zelluläre Prozessierung von GFP-wtPrP ist vergleichbar mit der von nativem PrP

3.2.1. Biochemische Analyse der Biosynthese von GFP-wtPrP

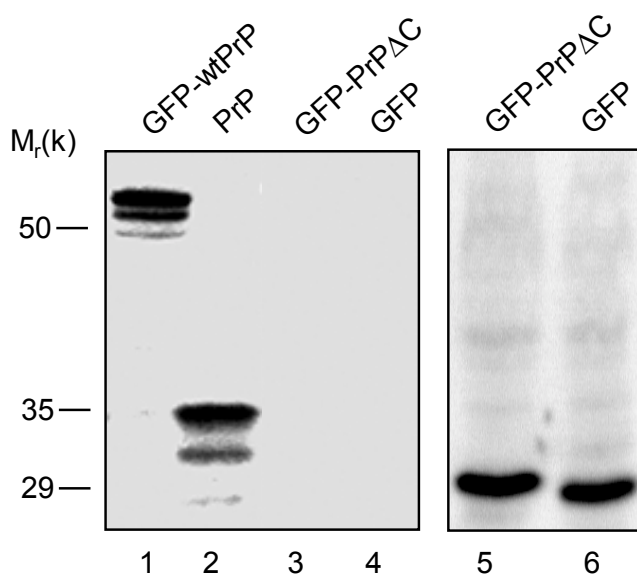
Im Anschluss an die Konstruktion der Vektoren sollte die Expression der Proteinchimären in eukaryontischen Zellen untersucht und mit dem Expressionsmuster von nativem wt PrP verglichen werden. Als Zelllinien wurden rekombinierte N2a-Zellen (rN2a-tTA, Klon 26 und 29; Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999) eingesetzt, die aufgrund ihres Tetracyclin-abhängigen Transaktivators die Option einer regulierbaren Überexpression gewährten. Diese Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor pGFP-wtPrP und den Kontrollen pGFP-PrP Δ N, pGFP-PrP Δ C und pGFPS65T transfiziert und 48 h bis zur Präparation der Proteinextrakte kultiviert. Als wt PrP-Kontrolle wurde der rekombinierte N2a-Klon 74 (Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999) eingesetzt, der im Stande ist, induzierbar wt Maus-PrP überzuexprimieren. Durch einen immunologischen Nachweis ("Western blot") nach der

PAGE konnten die Molekulargewichte der Proteine von 48000-58000 für GFP-wtPrP, 46000 für GFP-PrP Δ N, 29000 für GFP-PrP Δ C bzw. 27000 für GFP und 27000-37000 für wt PrP mit Hilfe eines anti-PrP- oder anti-GFP-Antikörpers festgestellt werden (s. Abb. 3a und 3b). Diese Molekulargewichte entsprachen den theoretisch zu erwartenden, die sich bei den Proteinchimären aus der Addition der Molekulargewichte der PrP-Anteile und GFP ergaben.

Die GFP-wtPrP Chimäre wies wie natives PrP eine Glykosylierung mit einfach- und doppelt-glykosylierten Formen auf (s. 3a, Spur 1 und 2), welche durch die Anwesenheit des antibiotischen Glykosylierungsinhibitors Tunicamycin vollständig eliminiert werden konnte und ausschließlich zur Expression der unglykosylierten Form von GFP-wtPrP (M_r 48000) führte (s. Abb. 3b). Somit konnte gezeigt werden, dass GFP-wtPrP nicht nur in N2a-Zellen exprimierbar war, sondern auch, bis auf die Erhöhung des Molekulargewichtes durch den GFP-Anteil, ein vergleichbares Expressionsmuster im „Western blot“ aufwies.

Um erste Hinweise über die zelluläre Lokalisation von GFP-wtPrP zu erhalten, wurden die transfizierten Zellen in PIPLC-haltigem, serumfreien Medium inkubiert, da das Enzym die Abspaltung von GPI-„verankerten“ Proteinen von der Zelloberfläche katalysiert (s. 2.3.9). Die Inkubation hatte eine Anreicherung von GFP-wtPrP im Inkubationsmedium zur Folge (s. Abb. 3c, Spur 3), welches, wie bei nativem PrP, für eine Lokalisation der Chimäre auf der Zelloberfläche und für eine Verbindung zur Zellmembran über einen GPI-„Anker“ sprach.

3a)



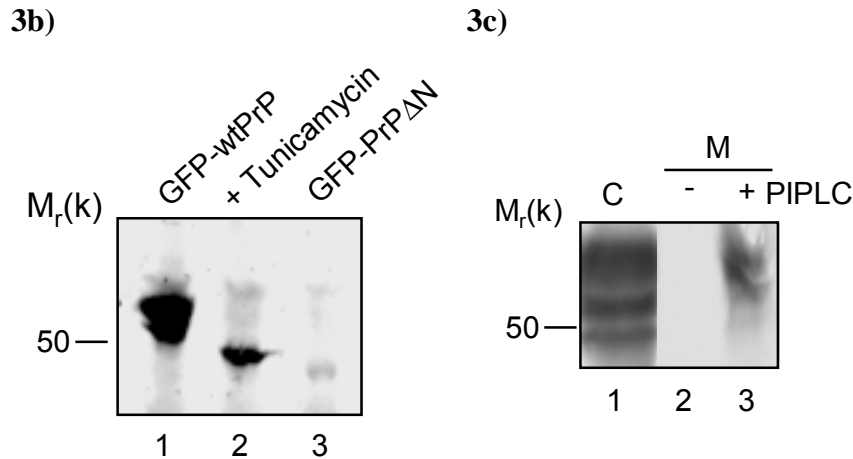


Abb. 3: „Western blot“-Analyse der Proteinchimäre GFP-wtPrP

Aufgetragen wurden je 100 μ g Zellextrakt (außer 3c, Spur 2 und 3) transfizierter N2a-Zellen. Die immunochemische Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe der Antikörper 6H4 (3a, Spur 1-4 und 3c), anti-GFP (3a, Spur 5 und 6) und Kan72 (3b).

3a) (vorherige Seite)

Spur 1: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP

Spur 2: Klon 74 (Lorenz, 1997; Windl *et al.*, 1999), 2 Tage Induktion der PrP-Expression

Spur 3: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP Δ C

Spur 4: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFPS65T

Spur 5: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP Δ C

Spur 6: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFPS65T

3b)

Spur 1: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP

Spur 2: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP und Inkubation mit Tunicamycin (5 μ g/ml) in DMEM für 20 h

Spur 3: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP Δ N

3c)

Spur 1: Zellextrakt (C) von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP

Spur 2: Inkubationsmedium (M) von Zellen transfiziert mit pGFP-wtPrP in (-) Abwesenheit von PIPLC

Spur 3: Inkubationsmedium (M) von Zellen transfiziert mit pGFP-wtPrP in (+) Anwesenheit von PIPLC (1 U/ml, 1h)

3.2.2. Analyse der zellulären Prozessierung von GFP-wtPrP

3.2.2.1 GFP-wtPrP wird wie natives PrP entlang eines sekretorischen Pfades transportiert

Zur Überprüfung des zellulären Transports von GFP-wtPrP wurden die transfizierten Zellen im Zeitverlauf mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dabei sollte die Durchführung der Transfektionen im transienten Ansatz die Beobachtung des zellulären Weges des Chimärenproteins ab dem Auftreten erster Fluoreszenzsignale bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes der zellulären Fluoreszenzverteilung ermöglichen. Die N2a-Zellen wurden dafür mit dem Konstrukt pGFP-wtPrP transfiziert und die Expression der Chimäre durch eine fortlaufend sich wiederholende mikroskopische Analyse der ansonsten unter Kultivierungsbedingungen (37°C, 10 % CO₂) gehaltenen Zellen untersucht. Erste diskrete intrazelluläre Fluoreszenzsignale konnten ca. 18-24 h nach der Transfektion detektiert werden, die anhand einer Immunfluoreszenzanalyse eindeutig als Golgi-Signale identifiziert wurden (Abb. 4a-c). Weniger stark auftretende GFP-wtPrP-Signale waren ebenfalls im fein „verästelten“ Netzwerk des Endoplasmatischen Reticulums detektierbar (Abb. 4d-f), so dass die Anwesenheit von GFP-wtPrP in den beiden, für den sekretorischen Weg zuständigen Organellen, ER und Golgi-Apparat, festgestellt werden konnte.

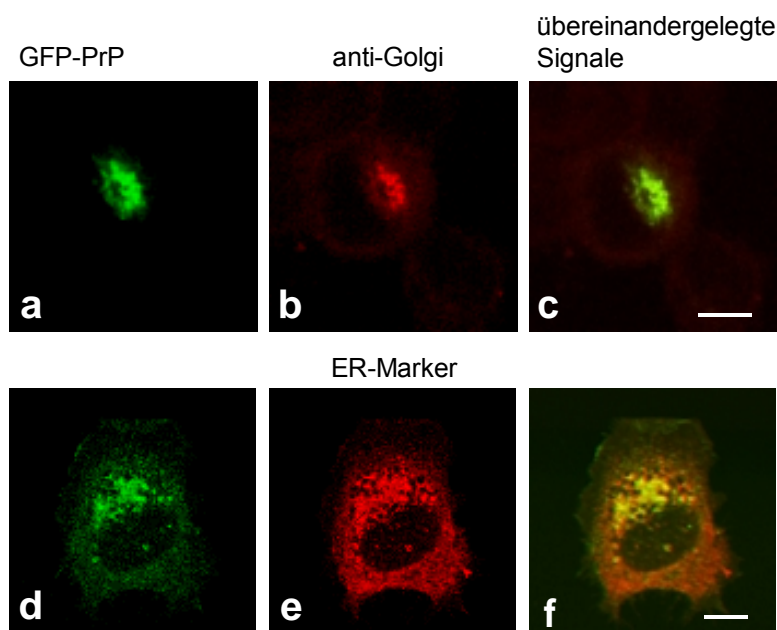


Abb. 4: (vorherige Seite)

Intrazelluläre Lokalisation von GFP-wtPrP in N2a-Zellen

(a-c) Die Anwesenheit von GFP-wtPrP (a) im Golgi-Apparat wurde mittels Immunfluoreszenz an transfizierten Zellen (20 h nach Transfektion) mit dem anti-Golgi-58 K-Protein-Antikörper (b) nachgewiesen, der nahezu vollständig mit dem GFP-PrP-Signal kolokalisierte (c). (d-f) Eine partielle Kolokalisation (f) von GFP-wtPrP (d) konnte auch mit dem ER-Marker „Concanavalin A, Alexa 594“ (e) gezeigt werden. Die rechten Spalten zeigen eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale (a+d, grün für GFP, b+e, rot für den Zellorganellmarker) einer Zeile. Größenbalken entsprechen 10 µm.

Der Transport von GFP-wtPrP vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat wurde durch den Einsatz von Brefeldin A (BFA) überprüft. Vorausgegangene Studien über diesen Metaboliten des Pilzes *Penicillium brefeldianum* zeigten bereits, dass die BFA-Inkubation von Säugerzellen binnen Minuten zu einer Fusion der Golgimembrane mit dem ER und somit auch zu einem retrograden Transport der im Golgi befindlichen, sekretorischen Proteinen führt (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Chardin & McCormick, 1999). Die GFP-wtPrP-exprimierenden Zellen zeigten bereits innerhalb der ersten 10 Minuten der Inkubation mit BFA den Beginn eines Auflösens des diskreten Golgisignals, welches innerhalb einer Stunde deutlich voranschritt und zu einem diffusen, „ER-typischen“ Verteilungsmuster mit wenigen punktuellen Signalen innerhalb der Zellen führte (s. Abb. 5). Da dieser Prozess in der für BFA beschriebenen Kinetik ablief, konnte davon ausgegangen werden, dass das Verschwinden des definierten Fluoreszenzsignals den Abbau des Golgi-Apparats ins ER widerspiegelte (Donaldson *et al.*, 1990). Des weiteren konnte durch Auswaschen der Droge und Kultivierung der Zellen in frischem Medium die erneute Entstehung eines definierten Fluoreszenzsignals bzw. der Wiederaufbau des Golgi-Apparates festgestellt werden (s. 3.3.3.1, Abb. 17 a,g). Die Ausbildung des Golgi-Apparats in Abwesenheit von BFA und die zeitgleiche Entstehung des diskreten GFP-wtPrP-Fluoreszenzsignals konnte dabei als Indiz für einen Transport von GFP-wtPrP vom ER zum Golgi-Apparat angesehen werden.

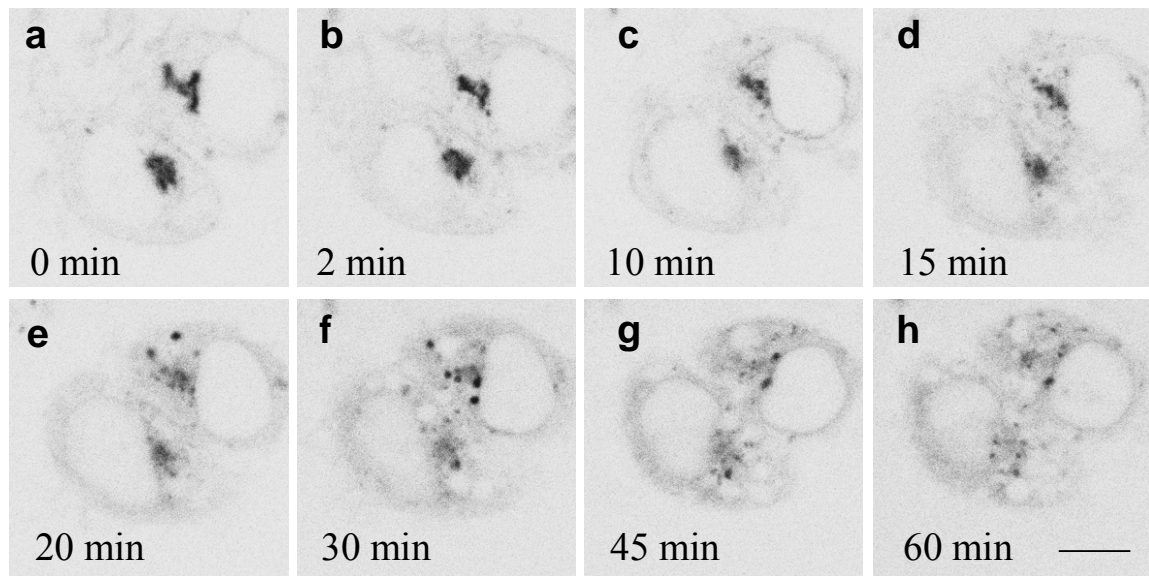


Abb. 5: Retrograder Transport von GFP-wtPrP vom Golgi in das ER durch Brefeldin A

Inkubation GFP-wtPrP-exprimierender Zellen mit Brefeldin A. Aufnahme transfizierter Zellen (20 h nach Transfektion) zu verschiedenen Zeitpunkten vor (a) bzw. nach (b-h) Zugabe von BFA (5 $\mu\text{g/ml}$). Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben die Minuten nach der Zugabe von BFA an. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Zur Überprüfung des Post-Golgi-Transports von GFP-wtPrP wurden N2a-Zellen mit einem diskreten Fluoreszenzsignal im Golgi-Apparat weiterhin über die Zeit mikroskopisch analysiert. In dem hier gezeigten Fall wurden transfizierte N2a-Zellen für 200 min ab dem Zeitpunkt 23 h nach Transfektion (Auftauchen der Signale schwankte zwischen den Zellen um ± 4 h) konfokal beobachtet und fortschreitend Aufnahmen der Zellen in der identischen mikroskopischen Ebene durchgeführt (s. Abb. 6). Anhand dieser Analyse konnte im Zeitverlauf deutlich die Besiedelung der Zellmembrane mit GFP-wtPrP detektiert werden, so dass für die transfizierten N2a-Zellen ein Phänotyp mit diskreten Fluoreszenzsignalen sowohl im Golgi-Apparat als auch auf der Zelloberfläche ca. 26 h (variierte um ± 4 h unter den Zellen eines Transfektionsansatzes) nach der Transfektion festgestellt werden konnte.

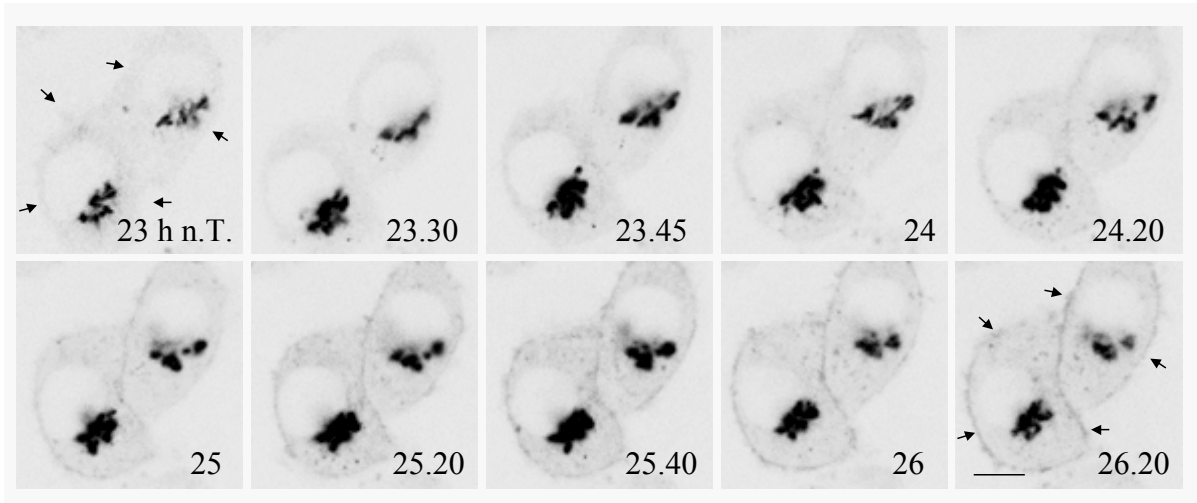


Abb. 6: Post-Golgi-Transport von GFP-wtPrP vom Golgi zur Zellmembran

Beobachtung der Expression von GFP-wtPrP in N2a-Zellen über 200 min, beginnend mit dem Zeitpunkt 23 h nach Transfektion (23 h n.T.). Die Zahlen in der rechten unteren Ecke geben den Zeitpunkt nach Transfektion in Stunden an. Die Pfeile zeigen die Position der Zellmembran. Es handelt es sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Dieses Verteilungsmuster veränderte sich nicht mehr während des gesamten Detektionszeitraumes und konnte sowohl für N2a-Zellen zum Zeitpunkt 48 h als auch 96 h nach Transfektion detektiert werden (s. Abb. 7). Der Einsatz des konfokalen Mikroskops ermöglichte darüber hinaus verschiedene Ebenen von Zellen seriell aufzunehmen, anhand derer die relativ homogene Verteilung von GFP-wtPrP auf der Zelloberfläche entlang des Zellkörpers von der apikalen bis zur basalen (mit zellulären Ausläufern versehenen) Seite der N2a-Zellen deutlich zu detektieren waren (s. Abb. 7a-f).

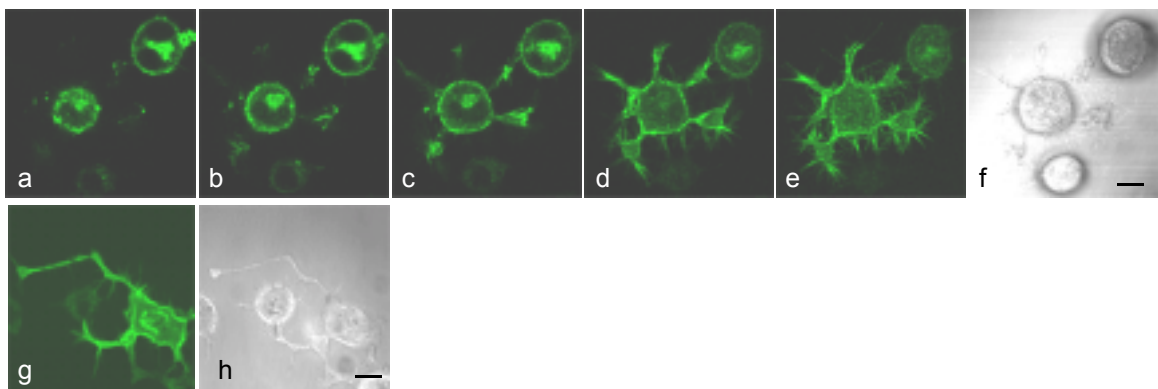


Abb. 7: (vorherige Seite)

Lokalisation von GFP-wtPrP in N2a-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion

Lebende N2a-Zellen wurden 48 h (a-f) und 96 h (g+h) nach Transfektion mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie analysiert. (a-e) Serielle Aufnahmen von apikal nach basal in 2 µm-Schritten durch 3 Zellen, von denen zwei GFP-wtPrP exprimieren. (f) Aufnahme derselben Zellen im Reflektionsmodus des konfokalen Systems. (g+h) Aufnahme einer GFP-wtPrP-exprimierende Zelle im (g) GFP- bzw. (h) Reflektionsmodus des konfokalen Systems. Größenbalken entsprechen 10 µm.

Der Einfluss der Glykosylierung von PrP auf die zelluläre Lokalisation wurde daraufhin mit Hilfe der Proteinchimäre GFP-wtPrP untersucht. Die transfizierten N2a-Zellen wurden dazu mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin inkubiert und die Expression von GFP-wtPrP mit Hilfe des konfokalen Mikroskops überprüft. Die Analyse ergab, dass Tunicamycin zwar effizient die Glykosylierung verhinderte (s. „Western blot“ Abb. 3b), jedoch nicht die Lokalisation des Proteins auf der Zellmembran beeinträchtigte (s. Abb. 8).

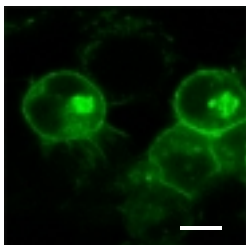


Abb. 8: Lokalisation von GFP-wtPrP nach Tunicamycin-Inkubation

Lokalisation von GFP-wtPrP in N2a-Zellen nach Inkubation mit Tunicamycin (5 µg/ml) für 20 h. Der Größenbalken entspricht 10 µm.

Somit konnten bereits existierende Daten zu unglykosyliertem wt PrP bestätigt werden, wonach die Glykosylierung für den Transport von PrP an die Zelloberfläche nicht notwendig zu sein scheint (Lehmann & Harris, 1997). Des weiteren konnten die hier aufgeführten Analysen von GFP-wtPrP eine diskrete und deutlich detektierbare Fluoreszenzverteilung der Proteinchimäre entlang eines sekretorischen Pfades vom ER/Golgi bis zur Zellmembran ermitteln, welche dem beschriebenen Transport bzw. der beschriebenen Lokalisation von wt PrP vollständig entsprach.

3.2.2.2 GFP-wtPrP weist wie natives PrP eine GPI-„verankerte“ Membranständigkeit auf

Zur Aufklärung, ob GFP-wtPrP wie natives wt PrP über einen GPI-„Anker“ mit der Zellmembran verbunden vorliegt, wurde die enzymatische Ablösbarkeit der Proteinchimäre von der Zelloberfläche überprüft. Zunächst sollte untersucht werden, ob GFP-wtPrP ebenfalls wie natives wt PrP eine extrazelluläre Ausrichtung (Orientierung in den extrazellulären Raum) auf der Oberfläche der transfizierten Zellen einnahm. Dazu wurde die Protease Trypsin in das Zellkulturmedium appliziert und das Oberflächensignal der Zellen mikroskopisch beobachtet. Die Inkubation mit Trypsin offenbarte dabei eine vollständige Zugänglichkeit des Enzyms zum membranständigen GFP-wtPrP und führte in Folge dessen zu einem kompletten Verschwinden des Fluoreszenzsignals auf der Zelloberfläche (s. Abb. 9 a-d). Daraufhin wurde die GPI-„Verankerung“ von GFP-wtPrP mit der Membran durch den Einsatz der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC, s. 2.3.9) überprüft. Die Inkubation der transfizierten Zellen mit PIPLC führte zu der, für das Enzym beschreibenden, unspezifischen Entfernung GPI-„verankerter“ Proteine von der Zellmembran und hatte für GFP-wtPrP das vollständige Verschwinden des Fluoreszenzsignals von der Oberfläche zur Folge (s. Abb. 9 e-h). Diese Ablösbarkeit von GFP-wtPrP nach PIPLC-Inkubation bestätigte das Ergebnis der „Western blot“-Analyse (s. 3.2.1., Abb. 3c) und zeigte, dass GFP-wtPrP (wie natives PrP) in den transfizierten N2a-Zellen eine Orientierung in den extrazellulären Raum aufwies und über einen GPI-„Anker“ mit der Zellmembran verbunden vorlag.

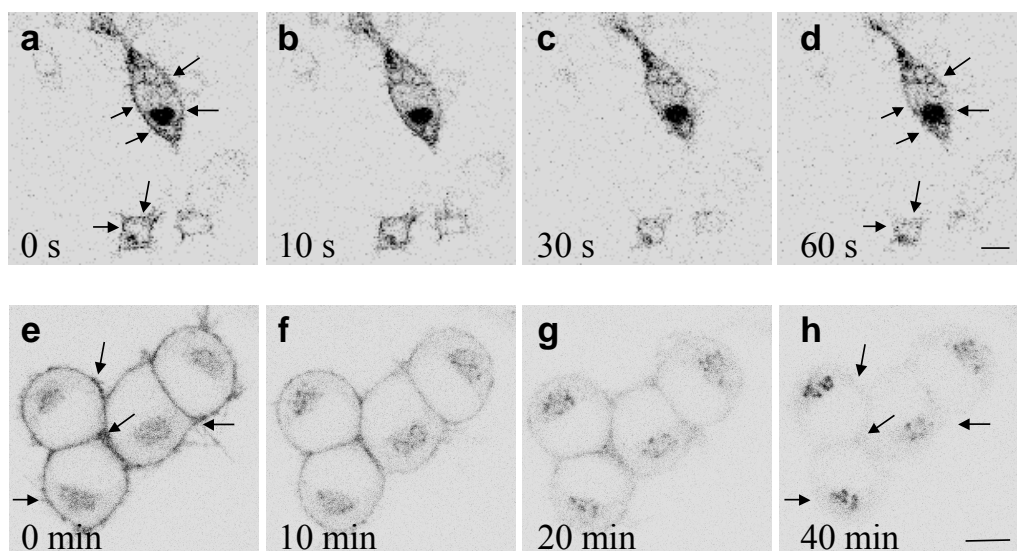


Abb. 9: (vorherige Seite)

Lokalisation von GFP-wtPrP an der Zellmembran

(a-d) Inkubation transfizierter N2a-Zellen mit Trypsin. GFP-wtPrP-exprimierende Zellen vor (a) und nach (b-d) Trypsin-Zugabe (1 x Trypsin/EDTA in serumfreien Medium). Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben die Sekunden nach der Zugabe von Trypsin an.

(e-h) Inkubation transfizierter N2a-Zellen mit PIPLC (1 U/ml). GFP-wtPrP-exprimierende Zelle vor (e) und nach (f-h) PIPLC-Zugabe. Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben die Minuten nach der Zugabe von PIPLC an. Die Pfeile markieren die Position der Zellmembran. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 µm.

3.2.2.3 GFP-PrP-Kontroll-Fusionsproteine weisen im Gegensatz zu GFP-wtPrP keinen sekretorischen Transport auf

Für eine aussagekräftige Analyse der zellulären Phänotypen von Prionproteinen (inklusive PrP-Mutanten) mit Hilfe von GFP-PrP-Chimären war es zwingend notwendig, dass GFP-PrP-Kontroll-Fusionsproteine, denen essentielle PrP-Sequenzen (bzw. auf DNA-Ebene genetische Informationen) fehlten, vom Wildtyp abweichende bzw. deutlich unterscheidbare Phänotypen aufwiesen. Aus diesem Grund wurden die Kontrollkonstrukte pGFP-PrPΔN und GFP-PrPΔC hergestellt, denen die genetische Information für die ersten 39 Aminosäuren (pGFP-PrPΔN) bzw. für die Aminosäuren 40-254 von PrP (pGFP-PrPΔC) fehlten (s. 3.1.1, Abb. 2). Den entsprechenden Kontrollproteinen fehlten somit entweder die komplette Signalsequenz (GFP-PrPΔN) oder der vollständige PrP-Bereich ab Aminosäure 40, inklusive der Oktapeptidregion, der gesamten C-terminalen Region und der Anheftungsstelle für den GPI-„Anker“ (GFP-PrPΔC). Als weitere Kontrolle wurde die Expression von GFP ohne PrP-Anteil überprüft, für das eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation (kein sekretorischer Transport) in Säugerzellen bereits beschrieben werden konnte (Rizzuto *et al.*, 1995).

Die mikroskopische Analyse ergab, dass die Expression von GFP-PrPΔN zu einer gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenz im Cytoplasma und im Zellkern (s. Abb. 10a und 10c) der transfizierten N2a-Zellen führte und somit phänotypisch der Signalverteilung von GFP glich. Ebenso zeigte auch das zweite Kontroll-Fusionsprotein, GFP-PrPΔC, eine cytoplasmatische und nukleäre Verteilung in den Zellen (s. Abb. 10b). Trotz des Vorhandenseins des Signalpeptids von PrP in diesem Fusionsprotein wurde es nicht

sekretorisch via ER/Golgi an die Oberfläche transportiert, sondern höchstwahrscheinlich vom ER ins Cytoplasma aussortiert. Somit konnte ausschließlich für das vollständige GFP-wtPrP (und nicht für die Kontroll-Fusionsproteine GFP-PrP Δ N und GFP-PrP Δ C und GFP) ein sekretorischer Transport entlang eines Pfades nachgewiesen werden, der dem von nativem wt PrP (Caughey *et al.*, 1989) glich.

Um mögliche Fehlinterpretationen durch eine unspezifische Autofluoreszenz auszuschliessen, wurden darüber hinaus N2a-Zellen zur Kontrolle „mock“-transfiziert und einer mikroskopischen Analyse unterzogen. Diese Zellen zeigten jedoch keinerlei Fluoreszenzsignale, die sich störend auf die spezifischen GFP-(PrP)-Signale transfizierter Zellen hätten auswirken können (s. Abb. 10d und 10e).

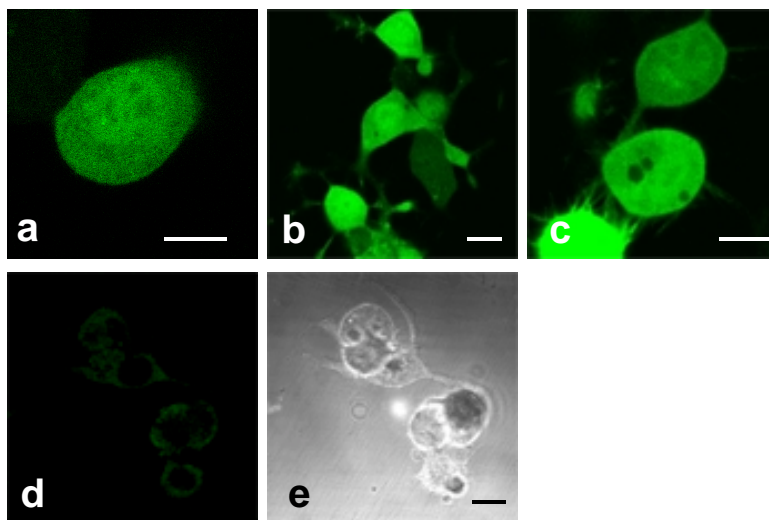


Abb. 10: Lokalisation der Kontrollproteine GFP-PrP Δ N, GFP-PrP Δ C und GFP-S65T in N2a-Zellen

Expression von (a) GFP-PrP Δ N, (b) GFP-PrP Δ C und (c) GFP-S65T in N2a-Zellen 48 h nach Transfektion. (d) Fluoreszenzsignal nicht-transfizierter N2a-Zellen zur Ermittlung der Autofluoreszenz (Negativ-Kontrolle), (e) identische Zellen wie in (d), Aufnahme im Reflektionsmodus des konfokalen Systems. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

3.3. Erweiterung des Modellsystems: Untersuchungen von PrP-Mutanten durch den Einsatz von GFP-PrP-Chimären

3.3.1 Konstruktion von GFP-PrP-Mutanten

Das Modellsystem der GFP-PrP-Chimäre mit Maus-PrP wurde weiterverwendet, um Missense-, Nonsense- und Insertmutationen in den *Prnp*-Anteil einzufügen und die Expression der Konstrukte sowohl mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie als auch biochemisch zu untersuchen. Insgesamt wurden neben pGFP-wtPrP weitere 14 GFP-PrP-Konstrukte hergestellt, von denen 11 mit humanpathogenen Mutationen in *PRNP* korrespondieren (s. Tabelle 4). Die drei weiteren Konstrukte kodieren für Chimären, die entweder Mutationen aufweisen, die zu der Zerstörung der zweiten (GFP-PrP T198A) bzw. beider Glykosylierungssequenzen (GFP-PrP T182A/T198A) führen oder deren PrP-Anteil aus Maus- und Mensch-PrP-Sequenzen (GFP-mhPrP) besteht. Dieses letzte Konstrukt diente der Kontrolle der PrP-Mutanten mit Oktapeptid-Wiederholungen, da deren PrP-DNA, mit Ausnahme der zusätzlichen Oktapeptid-Sequenzen, zum Kontrollkonstrukt identisch war.

Tabelle 4. GFP-PrP-Mutanten und ihre humanen PrP-Homologe

GFP-PrP-Chimäre mit Maus-PrP	Humanes PrP	Klinikopathologischer Phänotyp
PrP P101L	P102L	GSS
PrP W144X	Y145X	GSS
PrP Q159X	Q160X	früh einsetzende Demenz
PrP D177N	D178N	FFI
PrP T182A	T183A	CJD
PrP T182A/T198A	T183A/T199A	keine pathologisch beschriebene Mutation
PrP T198A	T199A	keine pathologisch beschriebene Mutation
PrP T187K	T188K	CJD
PrP T187R	T188R	CJD
PrP E199K	E200K	CJD
PrPmhPrP	humanes wt PrP	keine pathologisch beschriebene Mutation
PrPmhPrP+5Op	+ 5 Oktapeptide	heterogen
PrPmhPrP+6Op	+ 6 Oktapeptide	heterogen
PrPmhPrP+9Op	+ 9 Oktapeptide	heterogen

Für die Herstellung der Konstrukte mit Missense- und Nonsensemutationen wurden als Ausgangsvektoren pBs-Prnp und pGFP-wtPrP verwendet. Es wurde eine Mutagenese-Strategie (Fisher & Pei, 1997) durchgeführt, bei der mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase und (Mutation-vermittelnden) Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotiden (s. 2.1.15 und 2.2.11) der komplette Vektor pBs-Prnp amplifiziert wurde (s. Abb. 11). Die Unterscheidung zwischen dem Ausgangs- bzw. Matrizen-Vektor (wt) und dem Mutation-tragenden Vektor konnte dabei durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *DpnI* bewerkstelligt werden, welche ausschließlich die Spaltung ihrer Erkennungssequenz katalysierte, wenn diese methyliert vorlag. Die Methylierung erfolgte durch die Vervielfältigung der Ausgangs-DNA in einem *dam*⁺-*E. coli*-Stamm (XL1 blue, DH1), so dass nach PCR und anschließender Ligation das Restriktionsenzym zwar die Ausgangs-DNA aber nicht den mittels PCR produzierten, unmethylierten Vektor spaltete. Der *Prnp*-Anteil im mutagenisierten Vektor wurde sequenzanalytisch überprüft und das Mutation-tragende *Prnp*-Fragment über die unikalen *Bsu36I*- und *BamHI*- Sequenzen in den Expressionsvektor pGFP-wtPrP umkloniert.

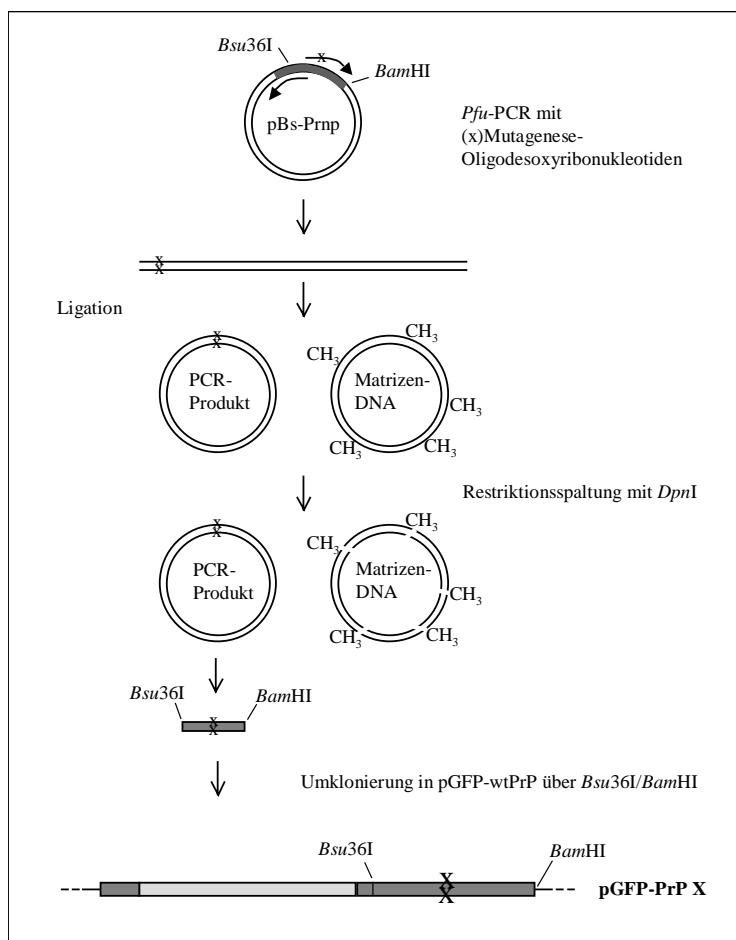


Abb. 11: (vorherige Seite)

Schematische Darstellung der Mutagenese mittels *Pfu*-PCR

Die einzuführende Mutation wird als X dargestellt. CH₃ symbolisiert methylierte Erkennungssequenzen für *DpnI*. Aufgeführt sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von mutagenisiertem *Prnp*. Die GFP-DNA wird als hellgraue und die PrP-DNA als dunkelgraue Balken dargestellt.

Die Herstellung der GFP-PrP-Konstrukte, deren Genprodukte eine Vervielfältigung von Oktapeptid-Sequenzen im N-terminalen Bereich von PrP aufweisen, erfolgte durch die Verwendung von bereits klonierter DNA oder PCR-Produkten deren Ausgangs-DNA humanen Ursprungs war, also dem Genom Mutation-tragender Patienten (DNA-Bank des Instituts für Neuropathologie, München) entstammte. Diese DNAs wurden über die unikalen Erkennungssequenzen für *Bsu36I* und *BstEII* zunächst in pBs-Prnp kloniert, so dass sie den DNA-Abschnitt zwischen Codon 54 und 186 von *Prnp* ersetzen und anschließend nach erfolgreicher Sequenzanalyse über *Bsu36I* und *BamHI* in den Expressionsvektor pGFP-wtPrP integriert (s. Abb. 12). Somit wurden in pGFP-wtPrP humane *PRNP*-Sequenzen eingefügt, die entweder mutierten Sequenzen entsprachen, deren Expression zu einer Vervielfältigung von PrP-Oktapeptiden (GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op, GFP-mhPrP+9Op) in der Proteinchimäre führten, oder als wt-Kontrolle für die humane wt Sequenz (GFP-mhPrP) diente.

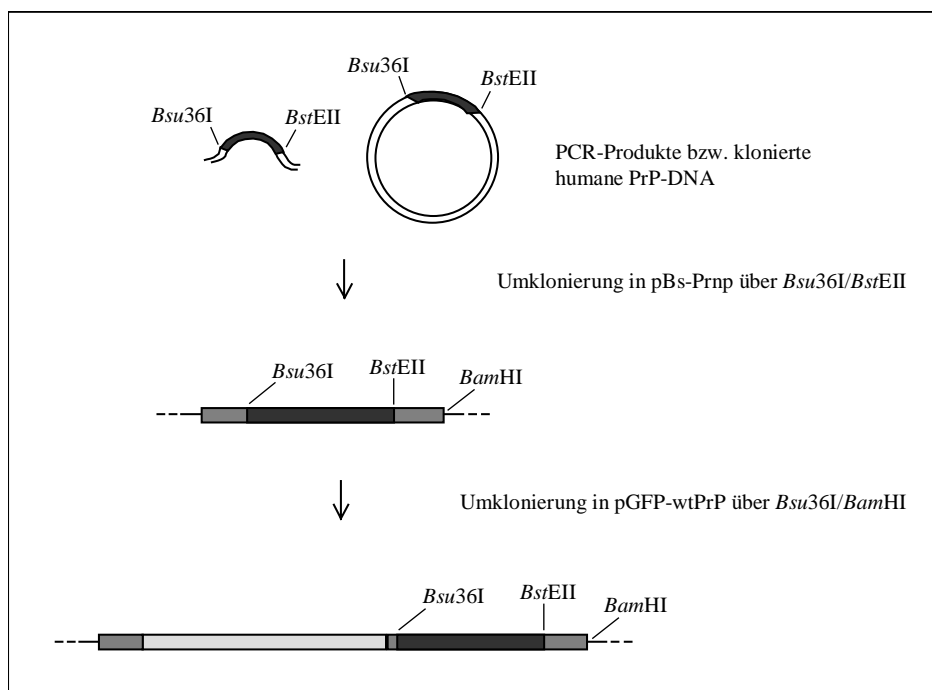


Abb. 12: (vorherige Seite)

Überblick der Herstellung von GFP-PrP-Chimären mit humanem PrP-Anteil

Die schwarzen Balken stellen die humane PrP-DNA dar. Aufgeführt sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung. Die GFP-DNA wird als hellgraue und die Maus-PrP-DNA als dunkelgraue Balken dargestellt.

3.3.2. Expression der GFP-PrP-Mutanten

3.3.2.1. Analyse der Biosynthese der GFP-PrP-Mutanten

Nach der Herstellung der 14 pGFP-PrP-Konstrukte mit Mutationen im *Prnp*-Anteil wurde deren Expression in N2a-Zellen kontrolliert. Dabei sollte insbesondere überprüft werden, ob diese Konstrukte erstens exprimierbar sind und zweitens deren Biosynthese zu veränderten Molekulargewichten und/oder zu einer in der „Western blot“-Analyse detektierbaren Veränderung der Glykosylierung im Vergleich zu GFP-wtPrP führte. Dazu wurden in einem parallelen Ansatz N2a-Zellen mit den Konstrukten (inklusive pGFP-wtPrP) transfiziert und nach 2 Tagen Kultur die Zellextrakte für eine „Western blot“-Analyse mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper eingesetzt. Diese Analyse zeigte erstens, dass alle Konstrukte in den Neuroblastomzellen exprimierbar waren und zudem eine vergleichbar starke Überexpression aufwiesen (s. Abb. 13). Des weiteren konnten für die Missense-Mutanten mit Einzel-Aminosäure-Austauschen (GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K, Spuren 2, 5, 6, 7, 11) im „Western blot“ un-, einfach- und doppelt-glykosylierte Formen mit einem Molekulargewicht von 48000-58000 nachgewiesen werden, die ein vergleichbares Expressionsmuster wie die Chimäre mit wt Maus-PrP bzw. wt Maus/Mensch-PrP (s. Abb. 13, Spuren 1, 12, 13) zeigten. Die Ausnahme bildeten die Mutanten, bei denen die Sequenzmotive für *N*-Glykosylierungen („consensus sequence“: Asparagin-X-Threonin, X= Isoleucin oder Phenylalanin an den Maus-PrP-Positionen 180-182 und 196-198) mutiert wurden. Die Chimären mit Aminosäure-Austauschen von Threonin nach Alanin an Position 182 (GFP-PrP T182A) und 198 (GFP-PrP T198A) zeigten jeweils un- und einfach-glykosylierte Formen (M_r 48000 bis 52000), während die Mutante, bei der beide Sequenzmotive verändert wurden (GFP-PrP T182A/T198A) ausschließlich nur die unglykosylierte Form

(M_r 48000) aufwies (Abb. 13, Spuren 8-10). Die hier mittels Mutagenese durchgeführte Zerstörung der Sequenzmotive für *N*-Glykosylierungen führte somit zu einer effizienten Inhibierung der Zucker-Anheftung, die sich jedoch nur auf die spezielle Glykosylierungsstelle und nicht auf die allgemeine Exprimierbarkeit dieser Mutanten auswirkte.

Die Expression der Nonsense-Mutanten GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X ergab in der „Western blot“-Analyse Signale für diese Chimärenproteine bei einem Molekulargewicht von ca. 40000 für GFP-PrP W144X und 42000 für GFP-PrP Q159X. Das Einfügen der Stop-Codons führte somit zu den entsprechenden Kettenabbrüchen bei der Translation bei *Prnp*-Codon 144 bzw. 159 und in Folge dessen neben verkürzten auch zu unglykosylierten Chimärenproteinen, da der C-terminale Bereich, inklusive der Glykosylierungsstellen, nicht mehr synthetisiert wurde (s. Abb. 13, Spuren 3+4).

Die Expression von pGFP-mhPrP+5Op, pGFP-mhPrP+6Op und pGFP-mhPrP+9Op führte zu Molekulargewichten von ca. 52000-62000 (GFP-mhPrP+5Op), 53000-63000 (GFP-mhPrP+6Op) bzw. 55000-65000 (GFP-mhPrP+9Op) und somit zu vollständig synthetisierten Proteinen, die jeweils um die Anzahl der zusätzlichen Oktapeptide vergrößert wurden (s. Abb. 13, Spuren 14-16). Bis auf die Zunahme des Molekulargewichtes konnten bei diesen GFP-PrP-Mutanten keinerlei Unterschiede im Expressionsmuster, d. h. in der Glykosylierung im Vergleich zu GFP-wtPrP bzw. GFP-mhPrP festgestellt werden (s. Abb. 13, Spuren 12+13).

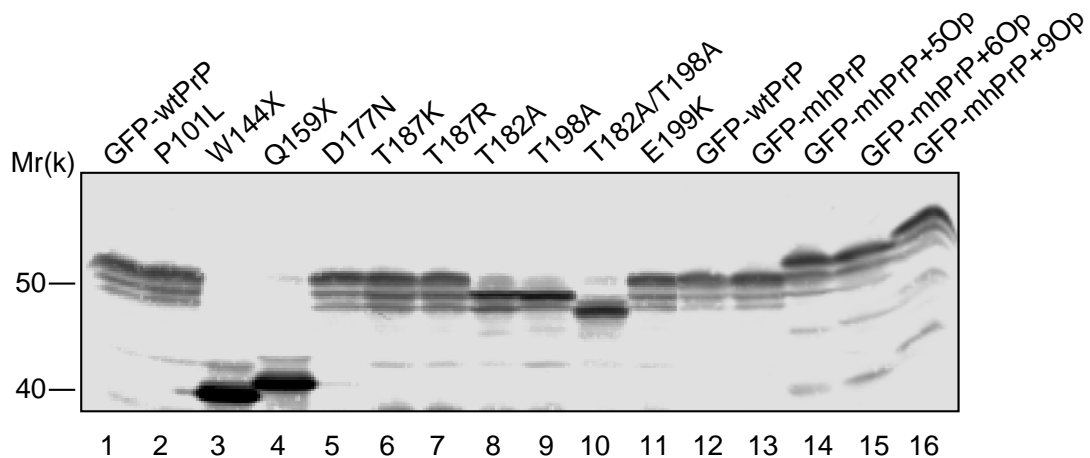


Abb. 13: (vorherige Seite)

Nachweis der Expression von GFP-PrP-Mutanten im „Western blot“

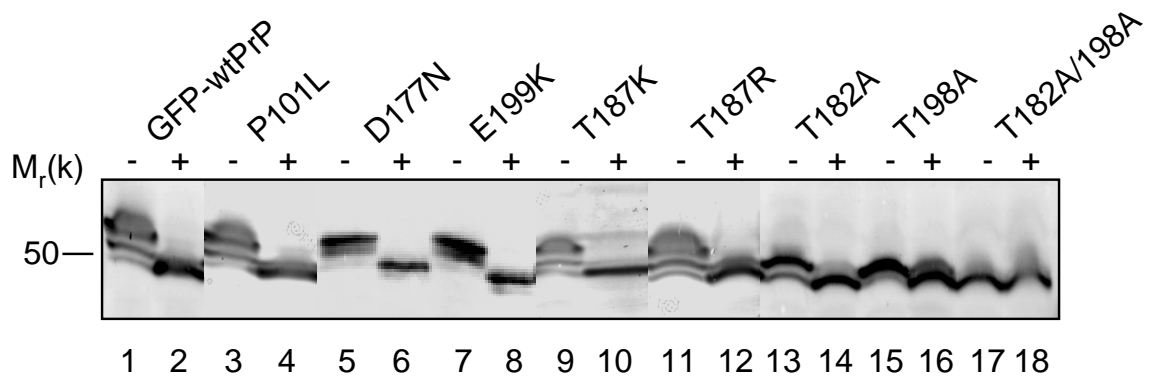
N2a-Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und die Zellextrakte (je 100 µg) mit Hilfe des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers immunochemisch analysiert.

- Spur 1: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP
- Spur 2: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP P101L
- Spur 3: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP W144X
- Spur 4: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP Q159X
- Spur 5: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP D177N
- Spur 6: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187K
- Spur 7: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187R
- Spur 8: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T182A
- Spur 9: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T198A
- Spur 10: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T182A/T198A
- Spur 11: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP E199K
- Spur 12: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP
- Spur 13: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP
- Spur 14: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+5Op
- Spur 15: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+6Op
- Spur 16: N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+9Op

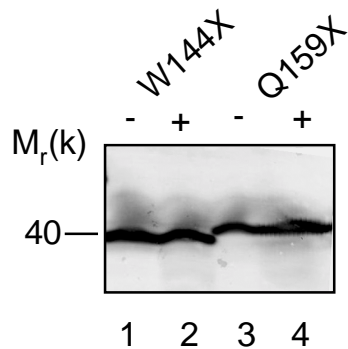
Zur weiteren Untersuchung der GFP-PrP-Chimären wurden die Proteine mit PNGase F behandelt (s. 2.3.11), um sie auf eine einzige, ihre unglykosylierte Form zu reduzieren. Mittels „Western blot“-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle glykosylierten Proteinchimären (GFP-wtPrP, GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T182A, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R, GFP-PrP T198A, GFP-PrP E199K, GFP-mhPrP, GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op, GFP-mhPrP+9Op) mittels PNGase F deglykosylierbar und mit Ausnahme der Insert-Mutanten (GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op, GFP-mhPrP+9Op) auf ein einheitliches Molekulargewicht reduzierbar waren (Abb. 14a-c). Die Insert-Mutanten GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op, GFP-mhPrP+9Op zeigten anhand der unglykosylierten Formen im Vergleich zu GFP-mhPrP deutlich ihre erhöhten Molekulargewichte, welche proportional mit der Anzahl der zusätzlichen Oktapeptide zunahmen (Abb. 14c). Des weiteren zeigten alle als unglykosyliert identifizierten Proteinchimären („Western blot“-Analyse, Abb. 13) keine weitere Reduzierung des

Molekulargewichtes nach PNGase F-Behandlung (GFP-PrP T182A/T198A, Abb. 14a, Spur 17+18; GFP-PrP W144X, Abb. 14b, Spur 1+2; GFP-PrP Q159X, Abb. 14b, Spur 3+4), so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Proteine vollkommen unglykosyliert vorlagen und auch keine kryptischen Glykosylierungsstellen (Rogers *et al.*, 1990) aufwiesen.

14a)



14b)



14c)

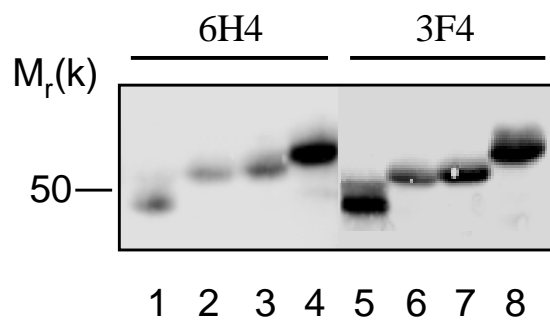


Abb. 14: (vorherige Seite)

Deglykosylierung der GFP-PrP-Chimären mittels PNGase F

Transfizierte N2a-Zellen wurden 48 h kultiviert und deren Proteinextrakte (jeweils 150 µg) entweder unbehandelt (-) eingesetzt oder vor der SDS-PAGE mit (+) PNGase F (500 U, 37°C, 16 h) behandelt. (14a+b) Die immunochemische Detektion erfolgte mit Kan72. (14c) Für einen besseren Größenvergleich wurden die GFP-Maus/Human PrP-Chimären mittels PNGase F deglykosyliert und mit Hilfe von 6H4 (Spur 1-4) und dem anti-human PrP-Antikörper 3F4 (Spur 5-8) nachgewiesen.

14a)

Spur 1 + 2: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP
 Spur 3 + 4: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP P101L
 Spur 5 + 6: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP D177N
 Spur 7 + 8: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP E199K
 Spur 9 + 10: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187K
 Spur 11 + 12: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187R
 Spur 13 + 14: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T182A
 Spur 15 + 16: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T198A
 Spur 17 + 18: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T182A/T198A

14b)

Spur 1 + 2: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP W144X
 Spur 3 + 4: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP Q159X

14c)

Spur 1 + 5: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP
 Spur 2 + 6: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+5Op
 Spur 3 + 7: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+6Op
 Spur 4 + 8: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-mhPrP+9Op

3.3.2.2 Proteinase K-Resistenzanalyse der GFP-PrP-Mutanten

Ein entscheidendes Kriterium bei der Diskriminierung von PrP^C und PrP^{Sc} ist die erhöhte Resistenz der pathogenen Isoform gegenüber einer Proteolyse mittels PK. Um diesbezüglich mögliche Unterschiede zwischen der Chimäre mit wt PrP und den GFP-PrP-Mutanten zu ermitteln, wurden Proteinextrakte transfizierter Zellen einem milden PK-Verdau (5 µg/ml, 37°C, 30 min) ausgesetzt. Die Transfektionen mit den verschiedenen DNA-Konstrukten wurden unter identischen Bedingungen parallel durchgeführt und 72 h nach Transfektion die Lysate bei gleichen Konzentrationen und gleichen Volumina mittels PK verdaut. Unter den gewählten Konditionen konnten für GFP-wtPrP keinerlei Proteinsignale im „Western blot“ mehr festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die wt PrP-Chimäre bei dieser PK-Konzentration vollständig degradiert wurde (Abb. 15, Spur 1+2). Im Gegensatz dazu zeigten die Proteinchimären GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R, GFP-PrP E199K (Abb. 15, Spuren 3-6 und 8) deutlich detektierbare Proteinsignale, die relativ vergleichbare Signalintensitäten und Molekulargewichte von ca. 20000-30000 aufwiesen. Diese Signale offenbarten das „PrP-typische“ Expressionsmuster mit un-, einfach- und doppelglykosylierten Formen und stellten den übrig bleibenden PK-resistenten Kern dieser Proteinchimären dar, die ansonsten ohne PK-Behandlung Molekulargewichte von 48000-58000 aufwiesen (s. 3.3.2.1, Abb. 13). Eine erhöhte PK-Resistenz konnte des weiteren auch für die Glykosylierungs-Mutante GFP-PrP T182A ermittelt werden, deren Signale im „Western blot“ zwar schwächer als bei den anderen resistenten GFP-PrP-Mutanten waren, jedoch unter den gewählten Bedingungen im Gegensatz zur wt PrP-Chimäre stets deutlich detektierbar waren (besonders die einfach-glykosylierte PrP-Bande; s. Abb. 15, Spur 7).

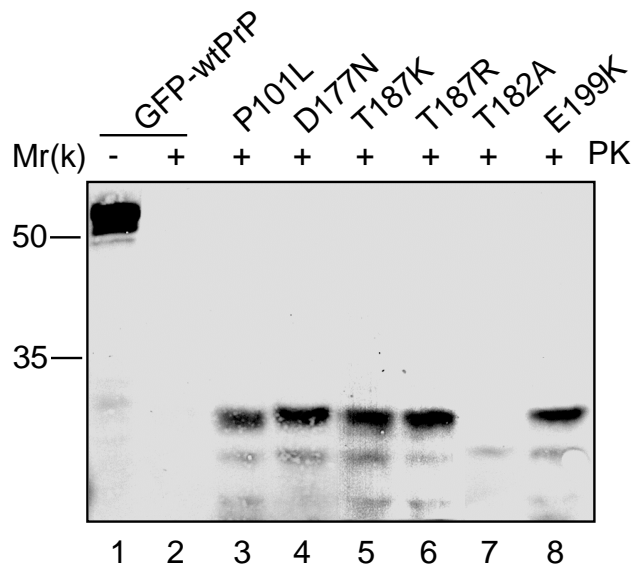


Abb. 15: PK-Resistenz von GFP-PrP-Chimären

Proteinextrakte (150 µg, identische Konzentrationen) von N2a-Zellen wurden 72 h nach Transfektion präpariert und für 30 min bei 37°C mit PK (5 µg/ml) inkubiert. Die immunochemische Detektion der PK-behandelten (+) und unbehandelten (-) Extrakte erfolgte mit 6H4.

Spur 1 + 2: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-wtPrP

Spur 3: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP P101L

Spur 4: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP D177N

Spur 5: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187K

Spur 6: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T187R

Spur 7: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP T182A

Spur 8: Proteinextrakt von N2a-Zellen, transfiziert mit pGFP-PrP E199K

3.3.3. Lokalisationsstudien der GFP-PrP-Mutanten mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie

Identisch zur GFP-wtPrP-Analyse wurde der zelluläre Transport aller GFP-PrP-Mutanten im Zeitverlauf ab dem Auftreten erster Fluoreszenzsignale bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes der zellulären Fluoreszenzverteilung mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Die ermittelten Phänotypen der GFP-PrP-Mutanten wurden dabei ohne Berücksichtigung einer klinikopathologischen Kategorisierung entweder auf Grund ihrer phänotypischen Übereinstimmung (bei vielen

Missense-Mutationen) oder wegen der systematischen Übereinstimmung ihrer Mutationen (Nonsense-Mutationen; Mutationen die zu einer Zerstörung der Glykosylierungs-Signalsequenzen führen, Insert-Mutationen) in eigenen Kapiteln beschrieben.

3.3.3.1 Einige GFP-PrP-Missense-Mutanten werden wie GFP-wtPrP sekretorisch zur Zellmembran transportiert

Für die zelluläre Phänotypisierung der Missense-Mutanten GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K wurden N2a-Zellen mit den entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert und erneut wie bei GFP-wtPrP die Expression mittels konfokaler Mikroskopie im Zeitverlauf analysiert. Dabei zeigte sich, dass diese Mutanten keinerlei signifikante Unterschiede in ihrem zellulären Transport bzw. ihrer Lokalisation im Vergleich zur wt PrP-Chimäre offenbarten. Über den gesamten Detektionszeitraum waren wie bei GFP-wtPrP spezifische Fluoreszenzsignale zunächst im Golgi (20 h nach Transfektion) und im weiteren Verlauf der Detektion dann auch Signale auf der Zellmembran zu detektieren (s. Abb. 16). Keinerlei zusätzliche Fluoreszenzsignale konnten für diese Mutanten z. B. im Zellkern oder auch in intrazellulären Organellen wie den Mitochondrien oder Lysosomen (untersucht mit Zellorganellmarker, Daten nicht gezeigt) gefunden werden. Diese GFP-PrP-Mutanten scheinen wie GFP-wtPrP (und natives PrP) sekretorisch zur Zellmembran transportiert zu werden, wobei sowohl ihre Expressionslevel (s. „Western blot“, 3.3.2.1, Abb. 13) als auch die Signalintensitäten im Golgi und auf der Zellmembran keine gravierenden Abweichungen zu GFP-wtPrP aufwiesen.

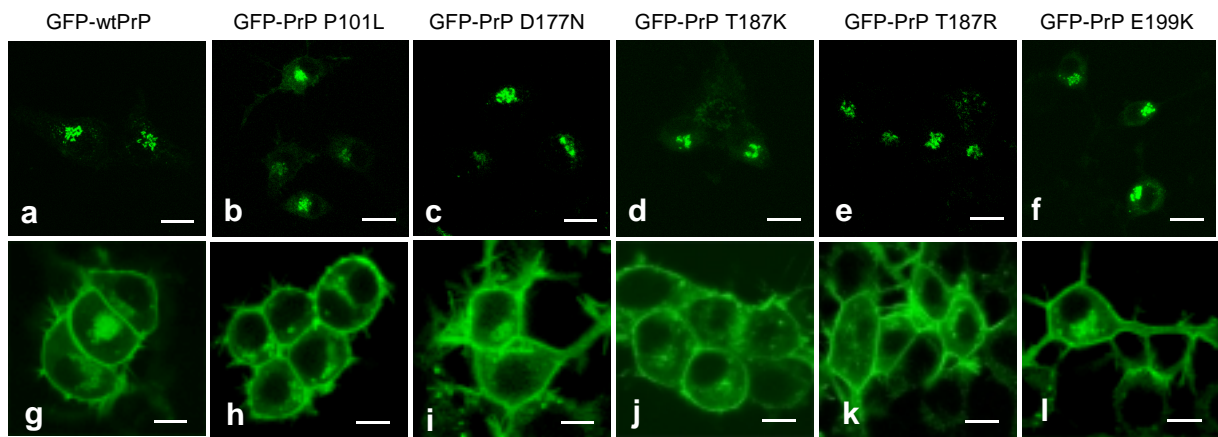


Abb. 16: Zelluläre Lokalisation von GFP-PrP-Missense-Mutanten

Konfokale Aufnahmen der Expression von (a,g) GFP-wtPrP, (b,h) GFP-PrP P101L, (c,i) GFP-PrP D177N, (d,j) GFP-PrP T187K, (e,k) GFP-PrP T187R und (f,l) GFP-PrP E199K in lebenden N2a-Zellen, 20 h (a-f) bzw. 48-72 h (g-l) nach Transfektion. Größenbalken entsprechen 10 μm .

Zur weiteren Analyse des sekretorischen Transports der GFP-PrP-Missense-Mutanten (GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K) wurden erneut, wie bei GFP-wtPrP, die transfizierten Zellen einer Inkubation mit Brefeldin A ausgesetzt. Dabei zeigte sich, dass auch bei diesen Mutanten die BFA-Inkubation zu einem Auflösen der diskreten Golgisignale führte und eine intrazelluläre, „ER-typische“ Signalverteilung detektiert werden konnte (s. Abb. 17a-f, gezeigt für transfizierte Zellen nach 2-3ständiger BFA-Inkubation). Diese Missense-Mutanten zeigten ebenfalls wie GFP-wtPrP nach dem Auswaschen der Droge und einer mehrständigen Kultur der Zellen in BFA-freiem Medium eine Rückgewinnung des diskreten Golgisignals (s. Abb. 17g-l), welches als Indiz der Wiederaufnahme des sekretorischen Transports entlang des ER/Golgi-Komplexes gedeutet werden kann.

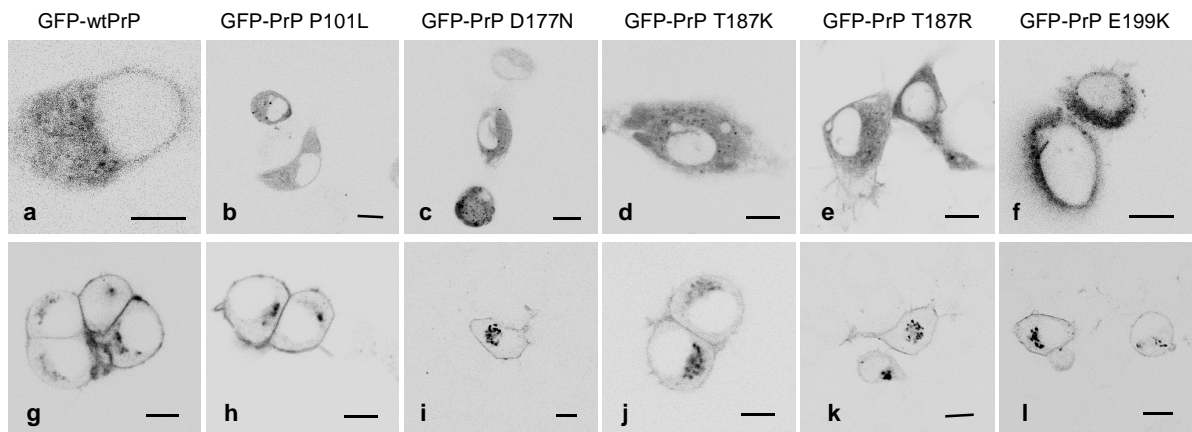


Abb. 17: Lokalisation von GFP-PrP-Missense-Mutanten in N2a-Zellen nach BFA-Inkubation

Inkubation transfizierter N2a-Zellen mit Brefeldin A (5 $\mu\text{g/ml}$). Konfokale Aufnahmen der Expression von (a,g) GFP-wtPrP, (b,h) GFP-PrP P101L, (c,i) GFP-PrP D177N, (d,j) GFP-PrP T187K, (e,k) GFP-PrP T187R und (f,l) GFP-PrP E199K in lebenden N2a-Zellen, nach (a-f) 2-3stündiger Inkubation mit BFA bzw. nach (g-l) 6-10stündiger (BFA-freier) Kultur der Zellen im Anschluss an eine BFA-Behandlung. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 μm .

3.3.3.2. Die Nonsense-Mutanten GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X weisen eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf

Die Expression der Proteinchimären GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X, die in der „Western blot“-Analyse als verkürzte und unglykosylierte Proteine identifiziert wurden (s. 3.3.2.1, Abb. 13 und 14b), sollte im Zeitverlauf mikroskopisch analysiert werden. Beide Mutanten offenbarten dabei ein spezifisches Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale, welches sich über die gesamte Detektionszeit nicht signifikant veränderte. Unabhängig davon, ob die konfokalen Aufnahmen 20 h, 48 h oder 96 h nach Transfektion durchgeführt wurden, zeigten beide GFP-PrP-Mutanten eine Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern der N2a-Zellen (s. Abb. 18). Dabei konnte besonders für GFP-PrP Q159X stets ein deutlich prominenteres Fluoreszenzsignal im Zellkern als im Cytoplasma festgestellt werden, während für GFP-PrP W144X trotz ebenfalls starken Kernsignals eine homogenere Verteilung mit hoher Fluoreszenzintensität auch im Cytoplasma nachgewiesen wurde.

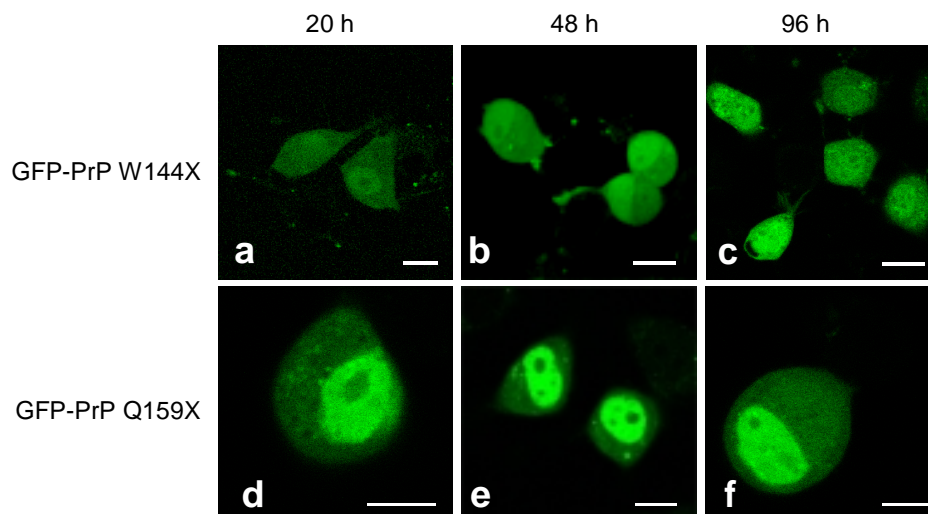


Abb. 18: Lokalisation der Nonsense-Mutanten GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X im Cytoplasma und Zellkern

Konfokale Aufnahmen der Expression von (a-c) GFP-PrP W144X und (d-f) GFP-PrP Q159X in lebenden N2a-Zellen, jeweils 20 h (a+d), 48 h (b+e) bzw. 96 h (c+f) nach Transfektion. Größenbalken entsprechen 10 μm .

Diskrete Fluoreszenzsignale im Golgi-Apparat oder auf der Zellmembran, wie sie u.a. für GFP-wtPrP (s. 3.2.2.1) ermittelt wurden, konnten zu keinem Zeitpunkt der Expression bei den beiden Mutanten detektiert werden. Entsprechende Kontrollen, die mittels Immunfluoreszenz eine Golgi-Lokalisation hätten aufzeigen können, scheiterten, und die Applikation von Trypsin (Daten nicht gezeigt) oder PIPLC ins Medium hatte keinerlei Auswirkungen auf die zelluläre Signalverteilung von GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X (Abb. 19, gezeigt für GFP-PrP Q159X).

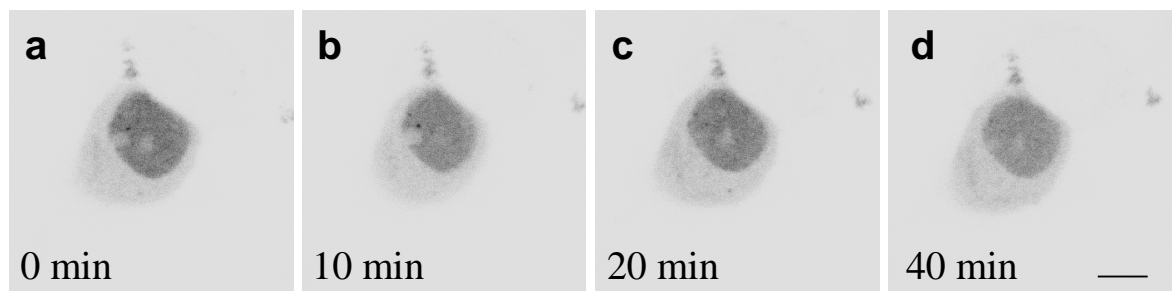


Abb. 19: Inkubation GFP-PrP Q159X-exprimierender N2a-Zellen mit PIPLC

Inkubation transfizierter N2a-Zellen mit PIPLC (1 U/ml). (a-d) GFP-PrP Q159X-exprimierende Zellen (48 h nach Transfektion) vor (a) und nach (b-d) PIPLC-Zugabe. Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben die Minuten nach Zugabe von PIPLC an. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

Diese Befunde, die für einen nicht-sekretorischen Pfad dieser Nonsense-Mutanten sprachen, wurden durch den Einsatz von Brefeldin A weiter überprüft. Die Inkubation mit Brefeldin A sollte zeigen, ob der für BFA-behandelte Zellen beschriebene retrograde Transport von Golgimembranen ins ER irgendwelche Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalverteilung der beiden GFP-PrP-Mutanten hatte. Die Proteinchimären zeigten jedoch im Gegensatz zu GFP-wtPrP (s. 3.2.2.1, Abb. 5) im Zeitverlauf der BFA-Inkubation keinerlei Veränderungen in ihrer zellulären Lokalisation (s. Abb. 20), welches als Indiz einer nicht-vorhandenen Golgi-Lokalisation und als weiterer Nachweis für einen nicht-sekretorischen Transport von GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X gedeutet werden konnte. Beide Mutanten zeigten selbst nach 20stündiger BFA-Inkubation der Zellen keine signifikanten Veränderungen der Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt), die ausschließlich im Cytoplasma und, besonders prominent für GFP-PrP Q159X, im Zellkern zu detektieren waren.

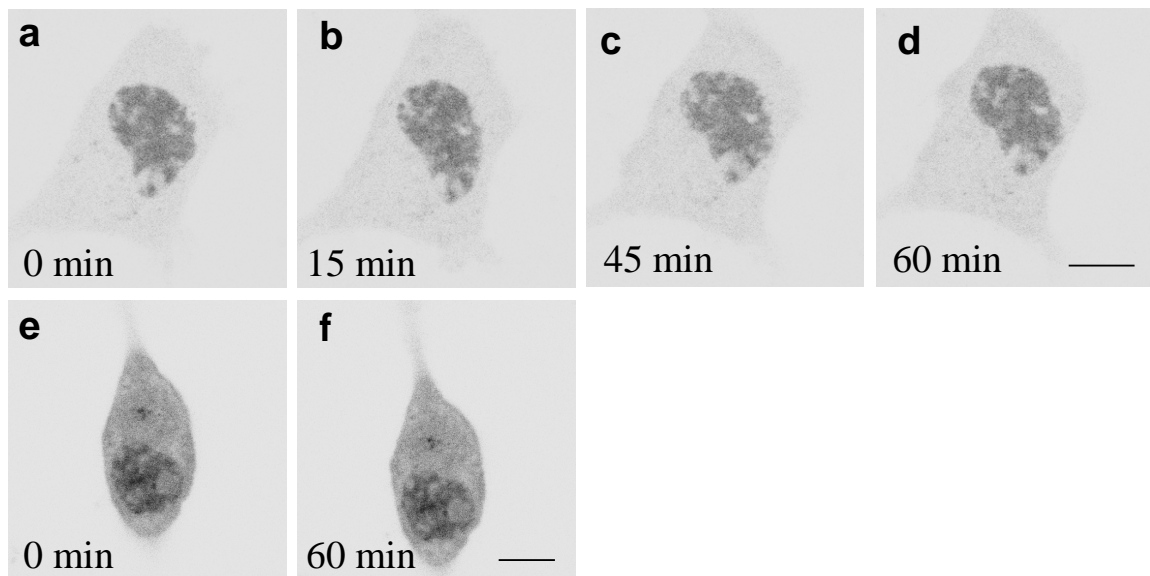


Abb. 20: Inkubation GFP-PrP W144X- und GFP-PrP Q159X-exprimierender N2a-Zellen mit Brefeldin A

(a-f) Inkubation transfizierter N2a-Zellen mit Brefeldin A (5 $\mu\text{g/ml}$). (a-d) GFP-PrP Q159X- und (e+f) GFP-PrP W144X-exprimierende Zellen vor (a+e) und nach (b-d und f) BFA-Zugabe. Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben die Minuten nach Zugabe von BFA an. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 μm .

Die deutlich überwiegende Signalintensität im Zellkern der pGFP-PrP Q159X-transfizierten Zellen wurde darüber hinaus durch so genannte „bleaching“-Experimente untersucht (s. 2.3.5; White & Stelzer, 1999). Dabei sollte durch eine irreversible Zerstörung der Fluoreszenz innerhalb eines auf den Zellkern begrenzten Bereiches die Rückgewinnung des Fluoreszenzsignals mikroskopisch analysiert werden. Die Analyse diente dabei nicht nur der Ermittlung des sich nach dem „bleaching“ einstellenden Phänotyps, sondern gleichzeitig auch einer ersten Einschätzung über die Zeiträume, in der solche Prozesse ablaufen. Anhand dieser „bleaching“-Experimente konnte gezeigt werden, dass nach der kompletten Zerstörung der Fluoreszenz im Zellkern es innerhalb 6-8 min zu einer erneuten, nahezu vollständigen Rückgewinnung des Signals im Nukleus kam (s. Abb. 21). Die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Zellkern geschah dabei auf eine direkte Weise, ohne dass es zunächst zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz im Cytoplasma oder einem intrazellulären Organell (Golgi etc.) kam. Dieses „bleaching“ des Zellkerns konnte in einer Zelle über die Zeit mehrmals wiederholt werden und führte stets zu einer

vergleichbaren Rückgewinnung der nukleären Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der starken Konzentration von GFP-PrP Q159X (M_r 42000) um einen intendierten Influx in den Zellkern und nicht um eine freie Diffusion zwischen Nukleus und Cytoplasma handelt.

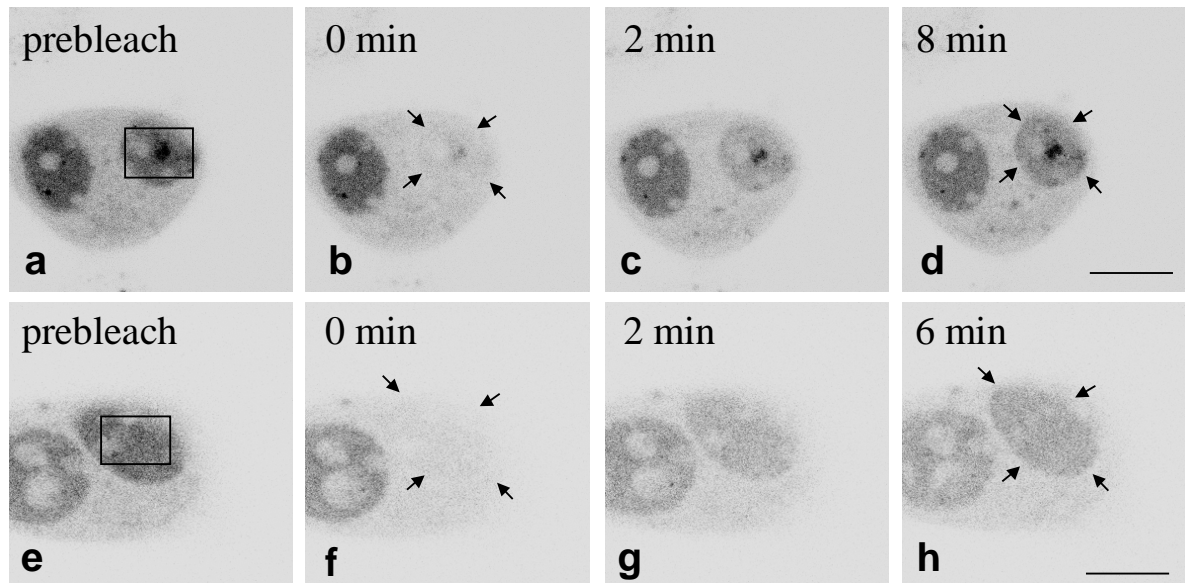


Abb. 21: „Bleaching“ des nukleären Fluoreszenzsignals in GFP-PrP Q159X-exprimierenden N2a-Zellen

(a-h) „Bleaching“-Experimente GFP-PrP Q159X-exprimierender Zellen. Gezeigt werden die Zellen vor dem „bleaching“ (a + e, „prebleach“) und der mittels Rechtecke gekennzeichnete Bereich des „bleaching“. Die Zahlen in den linken oberen Ecken geben den Zeitpunkt der Aufnahme in Minuten nach dem „bleaching“ an. Die Pfeile zeigen die Position des Zellkerns. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 μm .

3.3.3.3. Intrazelluläre Akkumulation der Glykosylierungs-Mutanten

Nachdem für ausschließlich unglykosyliertes GFP-wtPrP in Tunicamycin-behandelten N2a-Zellen ein normaler sekretorischer Transport zur Zellmembran festgestellt werden konnte (s. 3.3.2.1, Abb. 8), sollte mit Hilfe der Glykosylierungsmutanten GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A und GFP-PrP T182A/T198A die Auswirkungen von Mutations-bedingten Unter- bzw. Nicht-Glykosylierungen auf die zelluläre PrP-Lokalisation untersucht werden. Die mikroskopische Analyse der Expression offenbarte dabei einen von der wt PrP-Chimäre abweichenden Phänotyp, der identisch für alle drei Glykosylierungs-Mutanten detektiert werden konnte und sich mit zunehmender Zeit nach der Transfektion der Zellen immer deutlicher präsentierte. So konnte zwar für GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A und GFP-PrP T182A/T198A ca. 20 h nach Transfektion noch ein spezifisches Fluoreszenzsignal im Golgi-Apparat detektiert werden, an das sich jedoch im weiteren Zeitverlauf keine Besiedelung der Zellmembran wie bei GFP-wtPrP anschloss. Statt dessen weitete sich das intrazelluläre Signal fortschreitend aus und bildete letztlich ein breit angelegtes Fluoreszenzsignal um den Zellkern (s. Abb. 22).

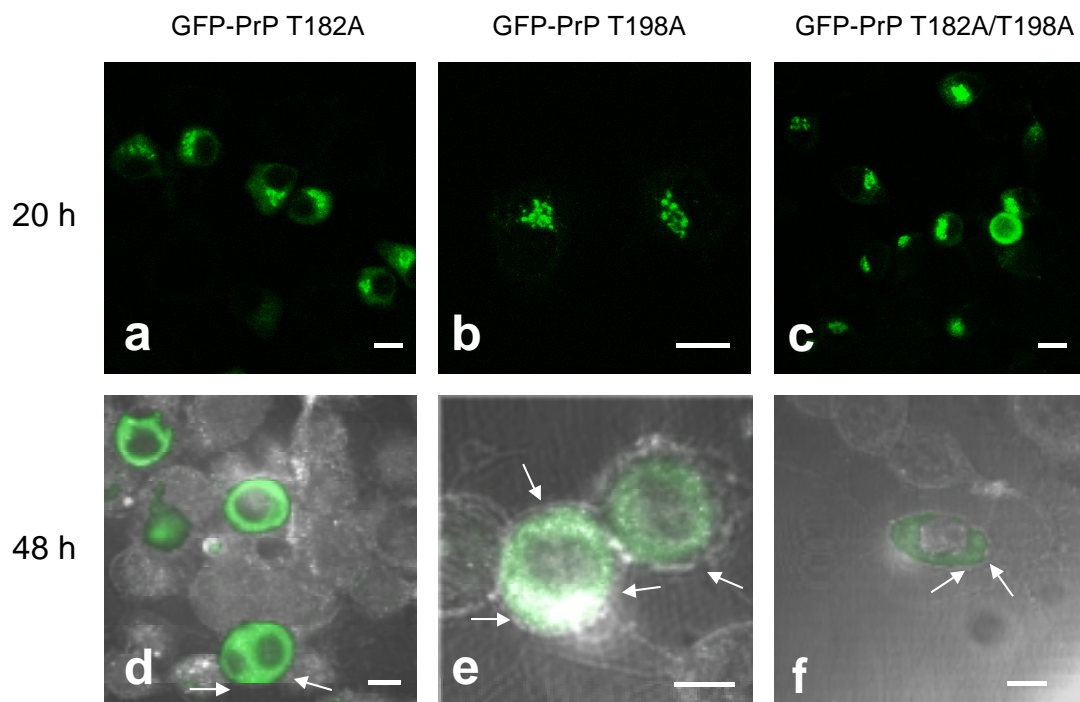


Abb. 22: (vorherige Seite)

Aberrante Lokalisation der Glykosylierungs-Mutanten

Konfokale Aufnahmen der Expression von (a,d) GFP-PrP T182A, (b,e) GFP-PrP T198A, (c,f) GFP-PrP T182A/T198A in lebenden N2a-Zellen. Die Aufnahmen zeigen die Verteilung der intrazellulären Fluoreszenzsignale 20 h (a, b und c) und 48 h (d, e und f) nach Transfektion. (d-f) Zur genaueren Darstellung der intrazellulären Akkumulation werden Überlagerungen identischer Zellen im GFP- und Reflektionsmodus des konfokalen Systems gezeigt. Die Pfeile zeigen Positionen der Zellmembran. Größenbalken entsprechen 10 µm.

Durch Zellorganellmarker konnte eine Lokalisationsbestimmung des Signals durchgeführt werden, die zeigte, dass die Proteinchimären zum Zeitpunkt 20 h nach Transfektion noch eine nahezu vollständige Kolokalisation mit dem Golgi-Marker aufwiesen und das Golgisignal sich deutlich vom Signal eines ER-Markers hervorhob (s. Abb. 23, a-f; gezeigt für GFP-PrP T182A). Das diskrete Golgisignal weitete sich jedoch im weiteren Zeitverlauf aus, so dass zum Zeitpunkt 48 h nach Transfektion nicht nur eine Kolokalisation mit dem Golgi-, sondern nun auch eine nahezu vollständige Kolokalisation mit dem ER-Marker detektiert werden konnte. Diese Analysen zeigten somit, dass die Glykosylierungsmutanten zunächst diskret im Golgi-Apparat lokalisiert waren, jedoch im weiteren Verlauf der Expression zunehmend eine ungewöhnlich starke Konzentration im ER einnahmen (s. Abb. 23, g-l; gezeigt für GFP-PrP T182A). Da generell sekretorische Proteine entlang ihres Weges vom ER in den Golgi-Apparat transportiert werden, können diese Ergebnisse als Indiz für eine Blockierung des Transports innerhalb des Golgi-Apparats gedeutet werden, die zu einer Anreicherung der Glykosylierungsmutanten zunächst im Golgi und anschließend im ER, also dem „davor-liegenden“ Kompartiment (entlang des Syntheseweges), führte. Das Verteilungsmuster des Signals änderte sich über die Zeit (bis 96 h nach Transfektion) nicht signifikant, so dass für die Glykosylierungsmutanten stets das intrazelluläre, perinukleäre Signal detektiert werden konnte, jedoch keinerlei Fluoreszenzsignale auf der Zellmembran festgestellt wurden.

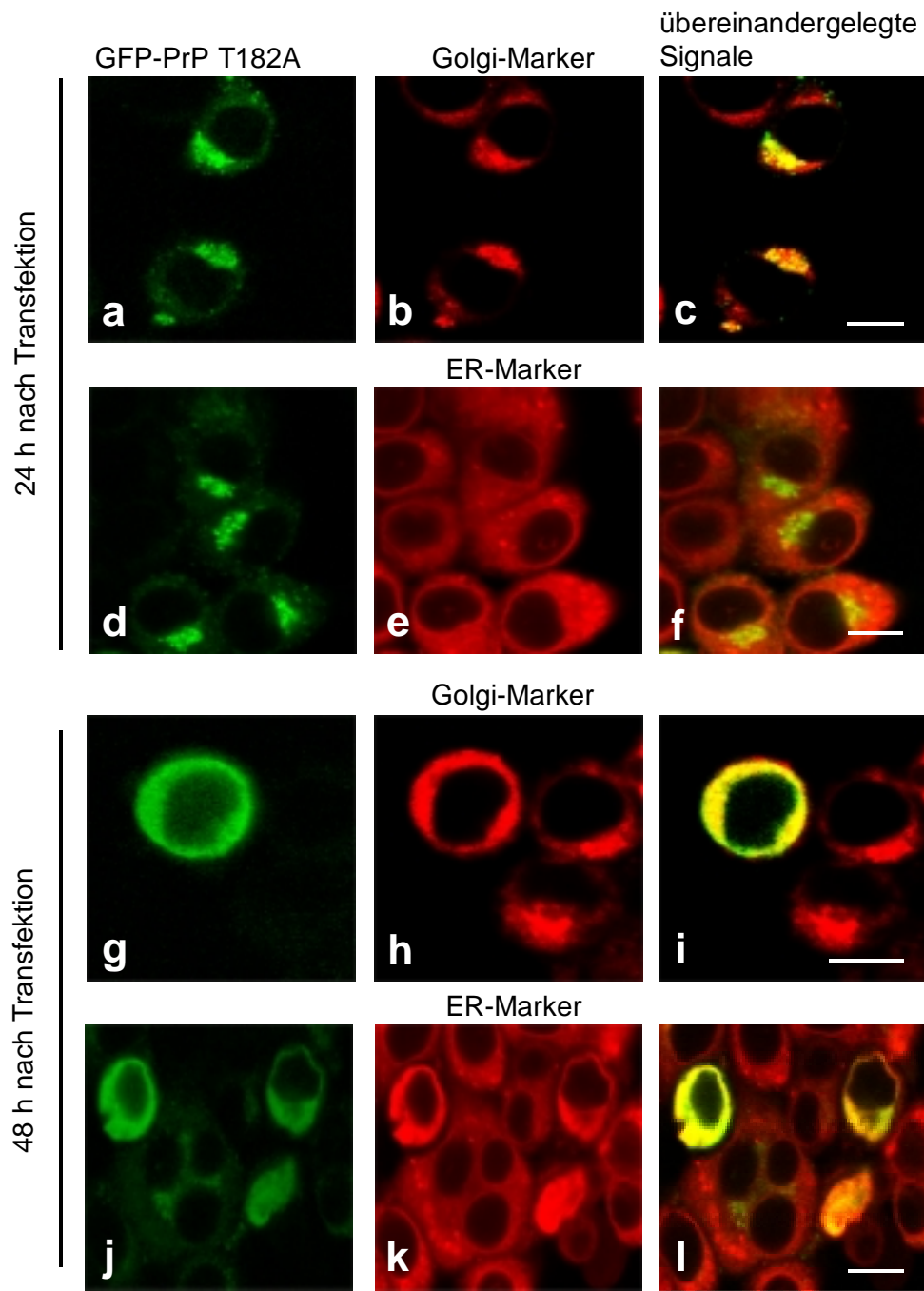


Abb. 23: Intrazelluläre Akkumulation von GFP-PrP T182A im ER/Golgi

Konfokale Aufnahmen der GFP-PrP T182A-Expression, 24 h (a+d) und 48 h (g+j) nach Transfektion. Lokalisationsbestimmungen von GFP-PrP T182A wurden für den Golgi-Apparat (b-c, h-i) mit dem Golgi-Marker „BODIPY TR ceramide“ (Molecular Probes) und für das Endoplasmatische Reticulum (e-f, k-l) mit dem ER-Marker „Concanavalin A, Alexa 594 conjugate“ (Molecular Probes) durchgeführt. Die linke Spalte zeigt die Fluoreszenzsignale der GFP-PrP T182A-Expression, die mittlere Spalte die Signale der Gegenfärbung und die rechte Spalte eine Überlagerung beider Signale einer Zeile. Größenbalken entsprechen 10 μm .

Die Inkubation mit Brefeldin A führte für die Glykosylierungs-Mutanten ausschließlich bei den transfizierten Zellen, die noch definierte Golgisignale aufwiesen (20 h nach Transfektion), zu einem „Auflösen“ des Fluoreszenzsignals bzw. des Golgi-Apparats ins ER (s. Abb. 24, a-d). Zellen, die bereits ein starkes perinukleäres Signal offenbarten (48 h nach Transfektion), zeigten nach BFA-Behandlung keine „Abschwächung“ der Fluoreszenz, sondern lediglich Umlagerungen besonders stark fluoreszierender Bereiche innerhalb der Ring-förmigen Struktur (s. Abb. 24, e-h). Diese Umlagerungen spiegeln höchstwahrscheinlich die Auswirkungen von Brefeldin A auf das ER wieder und können als weiterer Hinweis gedeutet werden, dass die Glykosylierungsmutanten in hoher Konzentration besonders im ER/Golgi-Komplex akkumulierten.

Die BFA-Behandlung von GFP-exprimierenden Zellen zeigte jedenfalls einen vollständig anderen Phänotyp mit einer homogenen Signalverteilung im Cytosol und Zellkern (Daten nicht gezeigt), so dass die Fluoreszenzsignale der Glykosylierungs-Mutanten nach BFA-Inkubation eindeutig dem ER/Golgi-Komplex zugeordnet werden konnten.

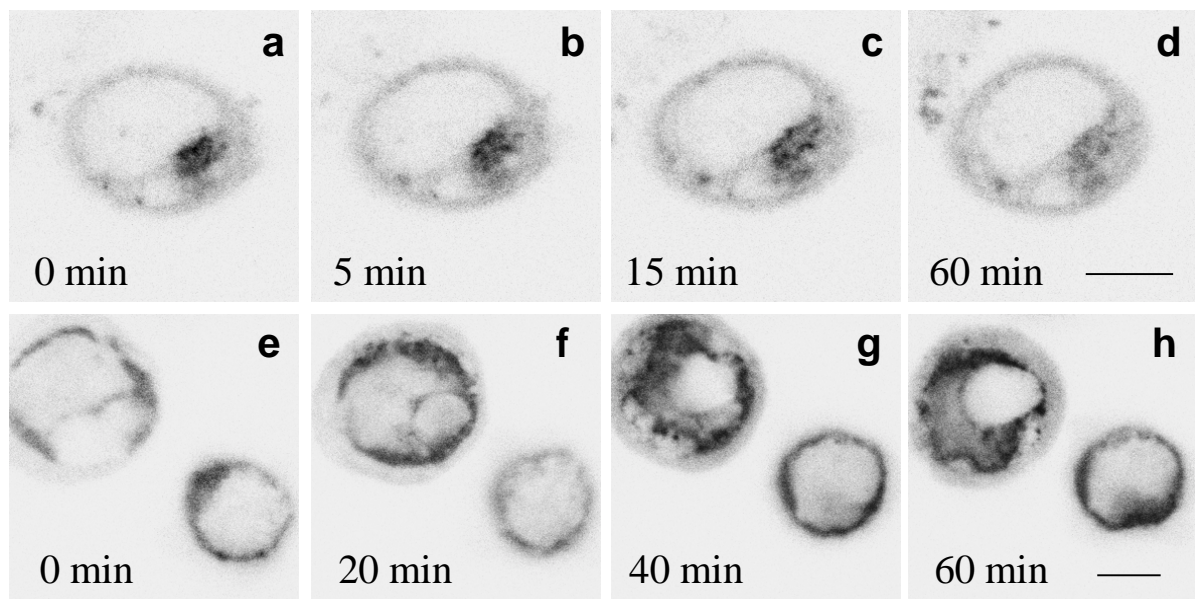


Abb. 24: Inkubation von GFP-PrP T182A-exprimierenden Zellen mit Brefeldin A

Gezeigt werden Zellen vor (a,e) und nach (b-d und f-h) Zugabe von BFA (5 µg/ml), 20 h (a-d) bzw. 48 h (e-h) nach Transfektion. Die Zahlen in der unteren linken Ecke geben den Zeitpunkt in Minuten nach Zugabe von BFA an. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 µm.

3.3.3.4. Abnehmender Transport der GFP-PrP-Chimären zur Zellmembran mit zunehmender Anzahl der Oktapeptide von PrP

Die drei Insert-Mutanten GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op und GFP-mhPrP+9Op wurden einer mikroskopischen Analyse unterzogen, um den Einfluss der zu Grunde liegenden Mutationen auf die zelluläre Lokalisation zu untersuchen. Die *PRNP*-Insertmutationen nehmen insofern eine Sonderstellung ein, da sie die einzige „Gruppe“ von *PRNP*-Mutationen darstellen, die zu einer erblichen Prionkrankheit führen und dabei den N-terminalen Bereich des Prionproteins betreffen (Palmer *et al.*, 1993; Palmer & Collinge, 1993).

Die Expression von GFP-mhPrP, pGFP-mhPrP+5Op, pGFP-mhPrP+6Op und pGFP-mhPrP+9Op führte 20 h nach Transfektion der N2a-Zellen zum Auftreten diskreter Fluoreszenzsignale im Golgi-Apparat und somit im Vergleich mit GFP-wtPrP zu einer identischen Lokalisation zu diesem Zeitpunkt (s. Abb. 25).

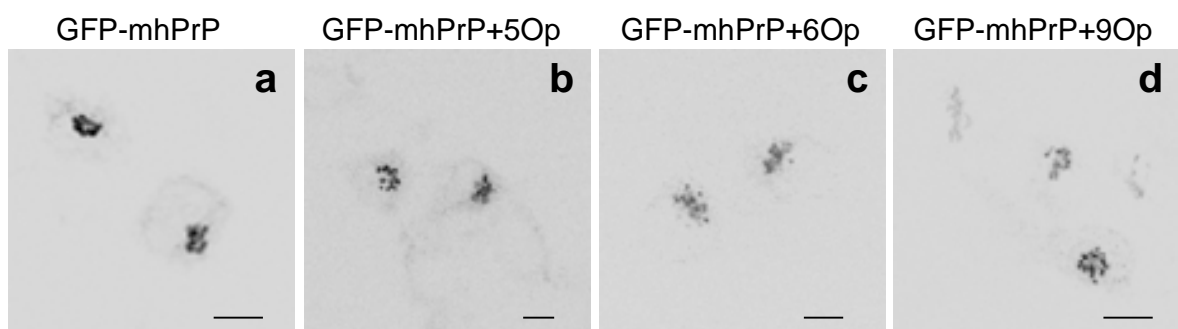


Abb. 25: Lokalisation der Insert-Mutanten im Golgi-Apparat zum Zeitpunkt 20 h nach Transfektion

Konfokale Aufnahmen der Expression von (a) GFP-mhPrP, (b) GFP-mhPrP+5Op, (c) GFP-mhPrP+6Op, (d) GFP-mhPrP+9Op in N2a-Zellen, 20 h nach Transfektion. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 µm.

Signifikante Unterschiede manifestierten sich erst im weiteren Verlauf der Expression. Sowohl 48 h (Daten nicht gezeigt) als auch 72-96 h nach Transfektion konnte sowohl für GFP-mhPrP+5Op als auch für GFP-mhPrP+6Op im Vergleich zu GFP-mhPrP (oder GFP-wtPrP) eine deutlich weniger dichte Signalverteilung auf der Zelloberfläche detektiert werden (s. Abb. 26). Diese fiel besonders auf, wenn serielle Aufnahmen durch die

transfizierten Zellen durchgeführt wurden und somit genauere Einblicke über das membranständige Fluoreszenzsignals gewonnen werden konnten. Dabei zeigten, im Gegensatz zur wt-Kontrolle GFP-mhPrP (mit einem homogenen und dichten Membransignal, s. Abb. 26, a-f), die beiden Mutanten GFP-mhPrP+5Op und GFP-mhPrP+6Op nur eine sehr dünne Besiedelung der Zellmembran mit nur wenigen Abschnitten einer hohen bzw. zu GFP-mhPrP vergleichbaren Signalkonzentration (s. Abb. 26, g-r). Bezüglich des intrazellulären Signals konnten jedoch nach der Betrachtung mehrerer transfizierter Zellen keine Unterschiede zu dem Golgisignal von GFP-mhPrP festgestellt werden. Beide Mutanten zeigten wie GFP-mhPrP ein diskretes Golgi-Fluoreszenzsignal über den gesamten Zeitraum der Detektion (20-96 h nach Transfektion).

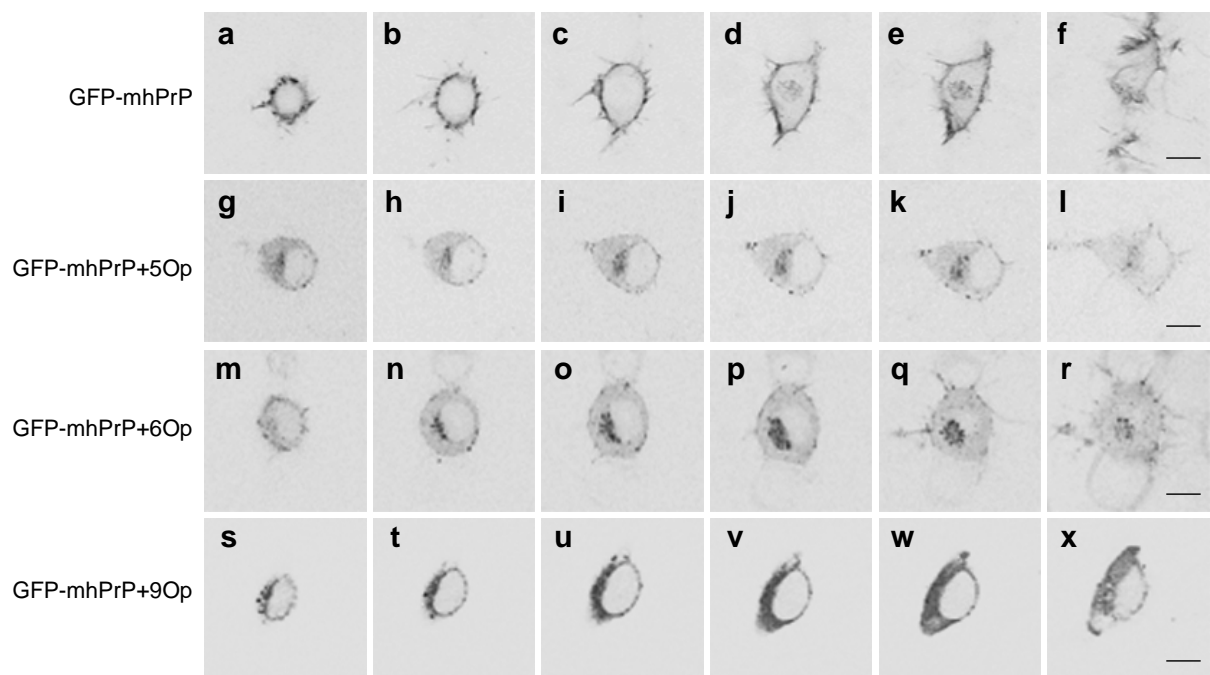


Abb. 26: Aberrante Lokalisation der Insert-Mutanten zum Zeitpunkt 72-96 h nach Transfektion

Konfokale Aufnahmen der Expression von GFP-mhPrP (a-f), GFP-mhPrP+5Op (g-l), GFP-mhPrP+6Op (m-r) und GFP-mhPrP+9Op (s-x) in N2a-Zellen, 72-96 h nach Transfektion. Gezeigt werden pro Zeile serielle Aufnahmen von apikal nach basal (Zellgrund) durch die Zellen in 1-2 μm -Schritten. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Größenbalken entsprechen 10 μm .

Die Proteinchimäre mit einer neunfachen Vervielfältigung von Oktapeptiden, GFP-mhPrP+9Op, zeigte noch stärkere Abweichungen zu den wt-Kontrollen (s. Abb. 26, s-x). Bereits 24-48 h nach Transfektion zeigten sich nur bei einer sehr geringen Anzahl von Zellen neben dem Golgi-Signal noch weitere Signale auf der Zellmembran, die nochmals wesentlich dünner im Vergleich zu GFP-mhPrP+5Op und GFP-mhPrP+6Op über der Zelloberfläche verteilt zu detektieren waren (Daten nicht gezeigt). Die meisten Zellen wiesen ausschließlich ein Golgi-Signal auf, welches im weiteren Verlauf der mikroskopischen Beobachtung immer stärker die Gestalt des perinukleären Fluoreszenzsignals wie bei den Glykosylierungs-Mutanten (GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A, GFP-PrP T182A/T198A) annahm. Zum Ende der Detektion (72-96 h nach Transfektion) waren in den N2a-Zellen mit GFP-mhPrP+9Op nur noch Fluoreszenzsignale entweder komplett um den Zellkern oder sehr stark im Golgi-Apparat zu detektieren und keinerlei Zellmembransignale mehr feststellbar (s. Abb. 27).

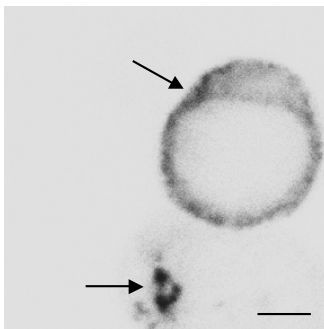


Abb. 27: Lokalisation von GFP-mhPrP+9Op im ER/Golgi 96 h nach Transfektion

Konfokale Aufnahmen der Expression von GFP-mhPrP+9Op in N2a-Zellen, 96 h nach Transfektion. Die Pfeile zeigen das Fluoreszenzsignal im Golgi bzw. ER/Golgi. Es handelt sich um invertierte Darstellungen, bei denen das grüne Fluoreszenzsignal schwarz dargestellt wird. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Die Expression von GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op und GFP-mhPrP+9Op offenbarte somit eine Beeinträchtigung des Transports vom Golgi zur Zelloberfläche, die mit der Anzahl der zusätzlichen Oktapeptide von PrP korrelierte und mit zunehmender Zeit nach der Transfektion immer deutlicher zu detektieren war.

Zusammenfassend kann anhand der geschilderten Untersuchungen zur zellulären Phänotypisierung von GFP-PrP-Chimären festgestellt werden, dass verschiedene Verteilungsmuster für die PrP-Mutanten detektiert werden konnten. Die Lokalisation von GFP-mhPrP+9Op ähnelte sehr dem Verteilungsmuster der Glykosylierungsmutanten GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A und GFP-PrP T182A/T198A, obwohl die verursachenden Mutationen ein Mal den N-terminalen Bereich und das andere Mal den C-terminalen Bereich von PrP betrafen. Die PrP-Mutanten mit einer 5- bzw. 6-fachen Wiederholung eines Oktapeptids zeigten tendenziell, trotz der reduzierten Signalstärken auf der Zellmembran, ein Verteilungsmuster, dass dem von GFP-wtPrP und den „zellulär unauffälligen“ PrP-Mutanten (GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K) entsprach. Ein weiterer, dritter, Phänotyp konnte für die C-terminal verkürzten PrP-Mutanten GFP-PrP W144X und GFP-PrP Q159X festgestellt werden, die eine intrazelluläre Verteilung im Cytoplasma und im Zellkern aufwiesen.

4. Diskussion

Die Herstellung einer Proteinchimäre, bestehend aus Maus-PrP und dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP), ermöglichte eine direkte und exakte Lokalisationsbestimmung von Prionproteinen in lebenden eukaryontischen Zellen. Somit konnte für Maus-PrP und eine Anzahl von PrP-Mutanten erstmalig deren zellulärer Transport über die Zeit in der vielfach verwendeten Maus-Neuroblastom-Zelllinie N2a unmittelbar durch die Fluoreszenz des integralen Markerproteins GFP mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie detektiert werden. Als Insertionsort von GFP wurde der N-Terminus von PrP ausgewählt, da dieser Bereich, im Vergleich zur stark strukturierten C-terminalen Region, als sehr flexibel beschrieben werden konnte (Donne *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1997). Die einzige Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Sma*I, die eine Spaltung der DNA genau zwischen den Codons 39 und 40 des offenen Leserahmens von Maus-PrP ermöglicht, erwies sich dabei als geeigneter Integrationsort der GFP-DNA. Diese Stelle wurde neben der generellen höheren Flexibilität des N-terminalen Bereiches auch deshalb gewählt, da sie zwischen den Sequenzmotiven für die Signalsequenz (Aminosäure 1-22) und der Oktapeptidregion (Aminosäure 51-90) von Maus-PrP liegt und somit nicht mit deren Ausbildung interferiert (Locht *et al.*, 1986). Obwohl bereits die Integration einer acht Aminosäuren großen FLAG-Sequenz zwischen Codon 88 und 89 von PrP beschrieben wurde, die weder zu einer Beeinträchtigung der zellulären Prozessierung noch der Umwandelbarkeit zu PrP^{Sc} führte (Telling *et al.*, 1997), stellt die in dieser Arbeit gewählte Integrationsstelle bei PrP eine angemessene Alternative für PrP-Chimären mit weiteren Proteinen bzw. größeren Peptiden dar.

Da die Funktion von PrP^C noch weitgehend unaufgeklärt ist, bestand nicht die Möglichkeit, mittels eines einfachen funktionellen Tests einen Vergleich zwischen der Chimäre mit wt PrP (GFP-wtPrP) und nativem PrP durchzuführen. Aus diesem Grund wurde GFP-wtPrP mit den bereits bekannten biochemischen und zellulären Charakteristika von PrP^C verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Chimäre wie natives PrP einen Transport entlang des sekretorischen Pfades via ER/Golgi vollzog und eine starke Konzentrierung sowohl im Golgi-Apparat als auch auf der Zelloberfläche aufwies (Caughey *et al.*, 1989; Zanusso *et al.*, 1998). Während der Translokation wurde GFP-wtPrP im ER/Golgi glykosyliert und als reifes Molekül über ein C-terminal angehängtes Phosphatidylinositolglykolipid (GPI) mit extrazellulärer Ausrichtung an der Membran

verankert, so dass es durch das Enzym PIPLC von der Oberfläche abgespalten werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Glykosylierung von PrP durch Tunicamycin keine detektierbaren Auswirkungen auf den Transport zur Zellmembran zur Folge hatte und somit existierende, mittels Immunfluoreszenz erhobene Daten für natives PrP (Lehmann & Harris, 1997) bestätigt werden. Die Insertion von GFP führte des weiteren nicht zu einer Erhöhung der Proteinase K-Resistenz, die auf eine Konformationsänderung von PrP hingedeutet hätte. Die üblicherweise für PrP^C aus Zellkulturen eingesetzte, niedrige PK-Konzentration (Lehmann & Harris, 1996a, 1996b, 1997; Lehmann *et al.*, 1997; Priola & Chesebro, 1998; Yanai *et al.*, 1999; Zanusso *et al.*, 1999; Capellari *et al.*, 2000) reichte für GFP-wtPrP wie bei nativem PrP für eine vollständige Degradation aus, so dass die Diskriminierbarkeit mittels PK, wie sie zwischen PrP^C und PrP^{Sc} besteht, auch für GFP-wtPrP gewahrt blieb. Die Chimäre mit wt PrP glich somit in allen untersuchten Parametern dem zellulären Phänotyp von PrP^C (Taraboulos *et al.*, 1992).

In herkömmlichen Studien konnte die Expression von PrP entweder durch biochemische bzw. immunologische Analysen lysierter oder fixierter Zellen untersucht werden, deren Aussagekraft der Güte des indirekten Nachweisverfahrens unterlag und keine direkte Beobachtung über die Zeit in lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen erlaubte. Die in dieser Arbeit eingesetzte PrP-Chimäre mit GFP ermöglichte somit eine Ausweitung des Spektrums der Untersuchungen zur zellulären Prozessierung von Prionproteinen und bot die Möglichkeit eines Vergleiches und einer Erweiterung der bereits existierenden Erkenntnisse über wt PrP und diversen PrP-Mutanten. Neben GFP-wtPrP wurden insgesamt 14 weitere PrP-Chimären hergestellt, von den 11 mit pathogenen PrP-Mutanten humaner, vererbbarer Prionkrankheiten korrespondieren. Die weiteren Mutanten dienten entweder der Aufklärung des Einflusses der Glykosylierung auf den zellulären Transport von PrP (GFP-PrP T198A und GFP-PrP T182A/T198A) bzw. als Wildtyp-Kontrolle (GFP-mhPrP) von PrP-Mutanten, die humane PrP-Sequenzen mit Oktapeptid-Wiederholungen trugen.

Von den 8 untersuchten Missense-Mutanten mit Einzel-Aminosäure-Austauschen (GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T182A, GFP-PrP T182A/T198A, GFP-PrP T198A, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K) zeigten 5 (GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K) einen

vergleichbaren zellulären Transport und keinerlei signifikante Abweichungen in der Lokalisation zu GFP-wtPrP. Die Beobachtung der Expression dieser Proteinchimären über die Zeit ergab ein nahezu synchrones Auftreten der spezifischen Proteinsignale von der Entstehung erster, deutlich zu detektierender Golgisignale bis hin zum Erreichen eines über den gesamten weiteren Detektionszeitraum gleichbleibenden Zustandes mit starken Konzentrationen der PrP-Chimären sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Golgi-Apparat. Die „Western blot“-Analysen offenbarten keine quantitativen Unterschiede in der Expressionsleistung oder im Glykosylierungsmuster innerhalb der Gruppe dieser Missense-Mutanten bzw. im Vergleich zu GFP-wtPrP, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Mutationen nicht zu einer generellen Beeinträchtigung der PrP-Biogenese beitrugen. Diese Mutanten zeigten jedoch eine Erhöhung der PK-Resistenz, die bereits nach drei Tagen Expression in N2a-Zellen nachgewiesen werden konnte. Dass es sich bei den PK-resistenten Formen um die GFP-PrP-Chimären und nicht um das native, endogene PrP in den N2a-Zellen handelte, wurde mit Hilfe von Zeitverlaufsstudien der PK-Inkubation festgestellt. Dabei konnte eine zunehmende Reduktion des Molekulargewichtes der Chimären mit zunehmender PK-Inkubationszeit detektiert werden, die von dem anfänglichen Molekulargewicht von 48000-58000 bis zu dem letztlich unter den gewählten Konzentrationen sich einstellenden Molekulargewicht von 20000-30000 eindeutig den GFP-PrP-Mutanten und nicht dem endogenen PrP zugeordnet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit zeigten diese PrP-Chimären eine weitere Eigenschaft nativen PrPs, nämlich die Fähigkeit einer Konformationsänderung, die sich in der Erhöhung der PK-Resistenz manifestierte und die auch schon für einige PrP-Mutanten der familiären Prionkrankheiten beschrieben werden konnte. Unter diesen befinden sich auch die GSS-assoziierte Mutante PrP P102L und die FFI- bzw. CJD-assoziierten Mutanten PrP D178N und PrP E200K, für die eine erhöhte PK-Resistenz sowohl im Hirngewebsmaterial der Betroffenen als auch in transgenen Maus- und Zellkulturstudien nachgewiesen wurde (Medori *et al.*, 1992; Chesebro *et al.*, 1993; Parchi *et al.*, 1998; Capellari *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 1989, 1990, 1994; Lehmann & Harris, 1996a, 1996b; Petersen *et al.*, 1996). Die Zellkulturstudien beschrieben eine membranständige Lokalisation für diese drei PrP-Mutanten, welche durch den ermittelten zellulären Phänotyp der hier verwendeten PrP-Chimären bestätigt werden konnte (Capellari *et al.*, 2000; Lehmann & Harris, 1996a, 1996b; Petersen *et al.*, 1996). Für die CJD-assoziierten PrP-Mutanten T188K und T188R (Windl *et al.*, 1999) lagen vor dieser Arbeit noch keinerlei publizierte Daten bezüglich ihrer Zellbiologie vor, so dass

durch den Einsatz der Proteinchimären GFP-PrP T187K und GFP-PrP T187R erstmalig Einblicke in deren zelluläre Prozessierung (Transport entlang des sekretorischen Weges zur Zellmembran, erhöhte PK-Resistenz) gewonnen werden konnten. Obwohl diese 5 Krankheits-assoziierten PrP-Mutanten vergleichbare Phänotypen aufzeigten, führen die zugrunde liegenden Mutationen in *PRNP* zu neuropathologisch unterscheidbaren und verschieden klassifizierten Prionkrankheiten (GSS, FFI bzw. CJD), so dass weitere Faktoren bzw. durch die Mutation gewonnene Dysfunktionen für die klinikopathologische Ausprägung der Krankheiten von entscheidender Rolle zu sein scheinen. Es konnte bereits in stärker biochemisch ausgeprägten Zellkulturstudien ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten bezüglich der Detergenzlöslichkeit und der PK-Resistenz bzw. eine erhöhte Membranassoziation für die PrP-Mutanten P101L, D177N und E199K (Lehmann & Harris, 1996a, 1996b) gezeigt werden, welches jedoch in anderen Studien entweder nur teilweise bestätigt werden konnte oder zu anderen, abweichenden Ergebnissen führte. So wurde in einer Studie eine verringerte Stabilität des unglykosylierten PrP D178N (Petersen *et al.*, 1996) und in einer anderen eine veränderte Glykosylierung und eine Zunahme von Fragmenten für PrP E200K (Capellari *et al.*, 2000) beschrieben. Als mögliche Erklärung dieser Unterschiede kann neben den generellen Limitierungen, die den uneinheitlichen Zellkulturstudien unterliegen, besonders der Einsatz verschiedener homologer (PrP und Zelltyp aus einer Spezies; Petersen *et al.*, 1996, Capellari *et al.*, 2000; diese Arbeit) und heterologer Modellsysteme (PrP und Zelltyp aus verschiedenen Spezies; Chesebro *et al.*, 1993; Lehmann & Harris, 1996a, 1996b) angesehen werden.

Zusätzlich zu PrP P102L wurde in dieser Arbeit eine weitere GSS-assoziierte Mutante (PrP Y145X) untersucht, deren Amber-Mutation an Codon 145 von *PRNP* zu einem verkürzten Prionprotein ohne C-Terminus (somit auch ohne GPI-„Anker“ und Glykosylierungs-Sequenzmotiven) führt (Kitamoto *et al.*, 1993; Ghetti *et al.*, 1996). Humanes PrP Y145X ist die erste PrP-Mutante, für die in der humanen Neuroblastom-Zelllinie M17 aufgrund einer gestörten post-translationellen Prozessierung eine Proteasomen-vermittelte Degradierung beschrieben werden konnte (Zanusso *et al.*, 1999). Obwohl die Mutante die N-terminale Signalsequenz trägt, wird sie nicht entlang des sekretorischen Weges transportiert und ins Medium sekretiert (keine Membranassoziation aufgrund des fehlenden GPI-„Ankers“), sondern höchstwahrscheinlich von den Qualitäts-Kontrollmechanismen des ER entlang eines proteasomalen Pfades ins Cytoplasma

aussortiert (Ellgaard *et al.*, 1999; Zanusso *et al.*, 1999). Die Proteinchimäre GFP-PrP W144X zeigte einen dementsprechenden zellulären Phänotyp mit einer starken Konzentrierung im Cytoplasma und im Zellkern, also an zellulären Orten, wo das Vorhandensein von Proteasomen bereits beschrieben werden konnte (Kopito, 1997; Bochtler *et al.*, 1999). Diese Verteilung im Cytoplasma und im Nukleus war bereits 1 Tag nach der Transfektion zu detektieren und veränderte sich nicht mehr über den gesamten Detektionszeitraum. Es konnten weder Signale auf der Zellmembran noch im Golgi-Apparat festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Großteil von GFP-PrP W144X bereits vor dem Golgi-Apparat ins Cytoplasma aussortiert wurde. Diese Annahme konnte auch durch die Versuche mit Brefeldin A untermauert werden, da der durch Brefeldin A initiierte retrograde Transport der Golgimembranen ins ER keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalverteilung von GFP-PrP W144X ausübte. Diese PrP Nonsense-Mutante zeigte also einen deutlich abweichenden zellulären Transport bzw. Metabolismus im Vergleich zur ebenfalls GSS-assoziierten PrP-Mutante P102L und somit einen aberranten zellulären Phänotyp, der zum Verständnis der bereits beschriebenen pathologischen Unterschiede innerhalb der GSS-klassifizierten Prionkrankheiten (Ghetti *et al.*, 1996; Kretzschmar *et al.*, 1991, 1992) beitragen könnte.

Ein mit GFP-PrP W144X vergleichbares Verteilungsmuster konnte auch für die zweite Nonsense-Mutante ermittelt werden, deren Stop-Signal sich etwas weiter C-terminal an der Codon-Position 160 von *PRNP* befindet (PrP Q160X). Diese erst kürzlich beschriebene Mutation wurde bei zwei Geschwistern innerhalb einer Gruppe möglicher bzw. wahrscheinlicher Alzheimer-Patienten entdeckt (Marksteiner *et al.*, 1999; Finckh *et al.*, 2000), die in „Western blot“-Analysen aus peripheren Leukozyten ein abweichendes bzw. verkürztes PrP-Muster aufwiesen. Die Expression der Proteinchimäre GFP-PrP Q159X in N2a-Zellen bestätigte die Synthese eines verkürzten und unglykosylierten Proteins und ermöglichte darüber hinaus, erste Erkenntnisse über den zellulären Transport dieser PrP-Mutante zu gewinnen. GFP-PrP Q159X glich GFP-PrP W144X insofern, dass es nicht entlang des sekretorischen Weges zur Zelloberfläche transportiert wurde, sondern ebenfalls eine Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern aufwies, die durch die Inkubation der Zellen mit Brefeldin A nicht beeinträchtigt wurde. Die Chimäre zeigte im Gegensatz zu GFP-PrP W144X eine signifikant stärkere Intensität im Zellkern und ein schwächeres Signal im Cytoplasma, was auf einen erhöhten Transport in den Zellkern hinweist. Der nukleäre Transport könnte durch das Vorhandensein eines Kern-Lokalisationssignals

(„nls“, für „nuclear localization signal“) bewerkstelligt werden, welches erst kürzlich für den N-Terminus von reifem PrP vorgeschlagen wurde (Jaegly *et al.*, 1998) und dem „nls“ des SV40 T-Antigens gleicht. Die auserkorene homologe Sequenz von PrP scheiterte jedoch, ein Markermolekül effizient in den Nukleus von HeLa-Zellen zu transportieren (Jaegly *et al.*, 1998), so dass die Ursachen für den nuklearen Influx von GFP-PrP W144X und besonders von GFP-PrP Q159X noch geklärt werden müssen. Beide Nonsense-Mutanten besaßen jedenfalls keinen GPI-„Anker“ und ihnen fehlten des weiteren auch weite Bereiche der C-terminalen strukturierten Region von PrP. Die mikroskopische Analyse erbrachte aber, trotz der vorhandenen Unterschiede in der Signalverteilung im Cytoplasma und Zellkern, einen dennoch vergleichbaren zellulären Phänotyp zwischen GFP-PrP Q159X und der Nonsense-Mutante PrP W145X (Muramoto *et al.*, 1997; Zanusso *et al.*, 1999), so dass ein vergleichbares zelluläres Schicksal für diese Mutanten angenommen werden kann. Aufgrund der hier gewonnenen Daten spricht vieles dafür, dass auch GFP-PrP Q159X bzw. humanes PrP Q160X einen von wt PrP abweichenden katabolischen Weg einschlägt und entlang eines proteasomalen Pfades degradiert wird. In wie fern diese Nonsense-Mutanten an dem pathogenen Mechanismus beteiligt sind, muss noch geklärt werden, es scheint jedoch nahezu ausgeschlossen, dass dieser dem Mechanismus der membranständigen PrP-Mutanten bzw. dem prognostizierten Prozess bei den erworbenen TSE-Fällen (Akkumulation und Aggregation von PrP^{Sc} entlang eines endocytotischen bzw. endosomalen Weges) gleicht (Caughey *et al.*, 1991b; Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992).

Drei PrP-Mutanten wurden zur weiteren Aufklärung des Einflusses der Glykosylierung auf den zellulären Transport von PrP in dieser Arbeit untersucht. Die Mutationen führten zu einem Austausch von Threonin zu Alanin entweder an einer der beiden (GFP-PrP T182A bzw. GFP-PrP T198A) oder an beiden (GFP-PrP T182A/T198A) existierenden Glykosylierungsstellen in PrP (Aminosäuren 180-182 und 196-198 von Maus-PrP; „consensus sequence“: N-X-T) und somit durch die Zerstörung der Sequenzmotive zu einer Verhinderung der Asparagin-gebundenen Glykosylierung. Für die homologe humane PrP-Mutante T183A konnte eine vererbte Form der TSE in einer brasilianischen Familie (Nitrini *et al.*, 1997) und in einem deutschen Patienten (Windl *et al.*, 1999; Finckh *et al.*, 2000) beschrieben werden, so dass der Verdacht entstand, dass eine unvollständige oder abweichende Glykosylierung als Ursache dieser Krankheit in Frage kommt (Lehmann & Harris, 1997). Darüber hinaus konnte eine spezifische Glykosylierung von PrP^{Sc}-

Molekülen für diverse Prion-Inokulate bzw. Prionstämme bereits nachgewiesen werden (Parchi *et al.*, 1996; Collinge *et al.*, 1996), so dass ein in der Glykosylierung begründeter Unterschied von PrP^{Sc} zu PrP^C nicht ausgeschlossen werden kann. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von ausschließlich unglykosyliertem GFP-wtPrP zu einer korrekten Lokalisation an der Zelloberfläche von Tunicamycin-behandelten N2a-Zellen (s. oben) führte, also die Glykosylierung für den normalen Transport von PrP nicht notwendig zu sein scheint. Obwohl die wichtige Aufgabe der Glykosylierung für die Faltung und die Reifung naszierender Polypeptidketten zunehmend erkannt wird (Helenius, 1994; Helenius & Aebi, 2001; Rudd *et al.*, 2001), bestätigt dieses Ergebnis nur das immer wieder in „Western blot“-Analysen von Oberflächen-PrP zu beobachtende Auftauchen auch der unglykosylierten PrP-Form, welche sich jedoch quantitativ stets am schwächsten präsentiert. Des weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass das unglykosylierte PrP in Tunicamycin-behandelten, Scrapie-infizierten N2a-Zellen (ScN2a) noch zu einer Konformationsänderung zu PK-resistentem PrP imstande ist, also auch diese Fähigkeit nativen PrPs beibehält (Taraboulos *et al.*, 1990).

Das Einfügen der Mutationen erbrachte zwar die effiziente Unterbindung der Glykosylierung bei den Glykosylierungs-Mutanten, führte jedoch für alle drei zu einem deutlich von GFP-wtPrP abweichenden zellulären Verteilungsmuster. Die Beobachtung der Expression dieser Chimären über die Zeit offenbarte eine Blockierung des Proteintransports im Golgi-Apparat, die zu einer intrazellulären Akkumulation sowohl im Golgi als auch im ER der N2a-Zellen führte. Somit bestätigten die Proteinchimären bereits existierende Daten über entsprechende Maus-PrP-Mutanten in CHO-Zellen (Lehmann & Harris, 1997) bzw. homologe Hamster-PrP-Mutanten in CV1-Zellen (Rogers *et al.*, 1990), die ebenfalls einen gestörten Transport innerhalb des sekretorischen Weges beschrieben. Des weiteren zeigten Mausstudien mit transgenen Glykosylierungs-Mutanten von Hamster-PrP (Syrian-Hamster PrP T183A, SHaPrP T199A, SHaPrP T183A/T199A) verschiedene, voneinander abweichende PrP-Verteilungsmuster in den Hirnen der Tiere, welche nicht nur zwischen den Mutanten und wt Hamster-PrP, sondern auch unter den Glykosylierungs-Mutanten festgestellt werden konnten. Weitere Unterschiede erbrachten darüber hinaus auch die Infektionsversuche dieser transgenen Mäuse mit Scrapie-Prionen, die eine Infektion nur bei den Mäusen mit dem SHaPrP T199A-Transgen, jedoch nicht bei den beiden weiteren Glykosylierungs-Mutanten (SHaPrP T183A und SHaPrP T183A/T199A) erzielen konnten (DeArmond *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse wurden

spekulativ einem möglichen Einfluss der unterschiedlichen PrP-Glykosylierung dieser Mutanten auf die Bildung verschiedener PrP^C-Konformationen zugeschrieben, die wiederum eine unterschiedlich hohe Affinität der PrP^C-Formen zu bestimmten PrP^{Sc}-Konformationen zur Folge hatten. Dass diese abweichenden Phänotypen in den transgenen Mäusen auf Grund der Glykosylierungsunterschiede und nicht auf Grund der Aminosäure-Austausche entstanden sind, konnten jedoch die Studien von DeArmond *et al.* (1997) nicht ausschließen. Signifikante Unterschiede zwischen GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A und GFP-PrP T182AT198A konnten in dieser Arbeit jedenfalls nicht festgestellt werden, so dass wiederum nicht ausgeschlossen werden kann, dass die in den N2a-Zellen zu beobachtenden Signalanreicherungen der Glykosylierungs-Mutanten (die möglicherweise unterschiedliche Konformationen einnehmen) dem Einsetzen diverser Mechanismen der Qualitätskontrolle für sekretorische Proteine entsprachen. Für unkorrekt prozessierte Proteine konnte jedenfalls sowohl eine Retention im ER und eine ER-assoziierte-Degradierung (ERAD), als auch eine Rückführung von Proteinen von stromabwärts („downstream“) gelegenen Organellen, wie z. B. dem Golgi-Apparat zurück ins ER beschrieben werden (Ellgaard *et al.*, 1999). Fasst man die Ergebnisse der Glykosylierungs-Mutanten mit den Daten für unglykosyliertes GFP-wtPrP (s. oben) und wt PrP (Lehmann & Harris, 1997) aus Tunicamycin-behandelten Zellen zusammen, so scheint der abweichende zelluläre Phänotyp der Glykosylierungs-Mutanten jedoch nicht primär in der fehlenden Glykosylierung, sondern in dem Einfügen der Punktmutationen, also in den Aminosäure-Austauschen begründet zu sein (Billeter & Wüthrich, 2000). Strukturstudien an rekombinantem PrP ermittelten u. a. für die ausgetauschten Threonine an Position 182 und 198 (183 und 199 bei Hamster-PrP) struktur-determinierende Funktionen (genauer: Interaktionen über Wasserstoffbrücken der Seitenketten mit anderen Aminosäuren), welche die ebenfalls in dieser PrP-Region auftretenden, jedoch zellulär unauffälligen PrP-Mutanten (PrP D177N, PrP T188K/R, PrP E199K) nicht aufweisen. So konnte eine Wasserstoffbrücke zwischen Threonin (Position 183 von Hamster-PrP) und Tyrosin (Position 162) beschrieben werden, die für die Verbindung einer β -Faltblatt-Struktur mit den für PrP beschriebenen α -Helices 2 und 3 zuständig ist und durch den Aminosäureaustausch T183A nicht mehr ausgebildet werden kann (Riek *et al.*, 1998; Billeter & Wüthrich, 2000). In der Studie von Riek *et al.* (1998) konnte für das zweite ausgetauschte Threonin (T198A) durch eine Interaktion mit Asparaginsäure (Threonin an Position 199 und Asparaginsäure an Position 202 von Hamster-PrP) die Ausbildung einer

so genannten „capping box“ (Harper & Rose, 1993) beschrieben werden, die zu einer Stabilisierung des N-Terminus der PrP-Helix 3 führt und möglicherweise durch einen Aminosäureaustausch nicht mehr entstehen kann. Diese Daten bekräftigen die eigenen Ergebnisse, dass die Glykosylierungs-Mutanten primär nicht durch eine unvollständige Glykosylierung intrazellulär akkumulieren, sondern höchstwahrscheinlich auf Grund einer strukturellen Veränderung in ihrem Transport durch Mechanismen der Qualitäts-Kontrolle gestoppt werden und nicht mehr oder nur extrem uneffizient an die Zelloberfläche gelangen. Zur Überprüfung dieser Struktur-Hypothese wäre es interessant, die entsprechenden Interaktionspartner der beiden Threonine, also Tyrosin an Position 161 und Asparaginsäure an Position 201 (Maus-PrP) zu verändern und den sich einstellenden Phänotyp mit dem hier für die Glykosylierung-Mutanten beschriebenen zu vergleichen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die Krankheits-assoziierte Mutante GFP-PrP T182A eine erhöhte PK-Resistenz festgestellt werden, die sich nicht deutlich von den anderen PK-resistenten PrP-Mutanten (s. oben, GFP-PrP P101L, GFP-PrP D177N, GFP-PrP T187K, GFP-PrP T187R und GFP-PrP E199K) unterschied. Da diese anderen PrP-Mutanten jedoch im Gegensatz zu GFP-PrP T182A den Golgi-Apparat passierten und korrekt an die Zelloberfläche transportiert wurden, kann das Einnehmen der veränderten Konformation(en) möglicherweise qualitative Unterschiede aufweisen oder an verschiedenen Orten entlang des sekretorischen Weges geschehen (Daude *et al.*, 1997). Die Chimäre GFP-PrP T182A bestätigte jedenfalls mit der erhöhten PK-Resistenz im Zellkulturversuch erst kürzlich gewonnene Erkenntnisse zu humanem PrP T183A, für das im Hirnhomogenat eines Betroffenen ebenfalls eine Erhöhung der PK-Resistenz festgestellt werden konnte (Schulz-Schaeffer, Windl & Kretzschmar, unpublizierte Daten). Der Zusammenhang zwischen der Pathogenität der CJD-assoziierten PrP-Mutante T183A und ihrer Konformationsänderung muss sicherlich in weiteren Studien noch genauer untersucht werden, auf jeden Fall führt die Mutation zu einem aberranten zellulären Phänotyp, der sich deutlich von dem der anderen in dieser Arbeit untersuchten Krankheits-assoziierten Missense- und Nonsense-Mutanten unterscheidet.

Neben den Punktmutationen, die den zentralen und C-terminalen Bereich von PrP betreffen, wurden auch PrP-Mutanten untersucht, die auf Grund von Insert-Mutationen eine Vervielfältigung von Oktapeptid-Wiederholungen im N-terminalen Bereich aufweisen. Diese PrP-Mutanten tragen im Gegensatz zu wt PrP mehr als 4 Kopien einer

sich wiederholenden 8-Aminosäuresequenz und die zugrunde liegenden Mutationen in *PRNP* konnten bereits als Ursache für familiäre TSEs verantwortlich gemacht werden (Goldfarb *et al.*, 1991, 1993; Owen *et al.*, 1990; Cochran *et al.*, 1996; Capellari *et al.*, 1997). Der Phänotyp dieser Krankheiten wurde als eher heterogen beschrieben, wobei häufig ein früher Krankheitsausbruch mit einem langen Verlauf bzw. ein mit zunehmender Anzahl der Oktapeptid-Wiederholungen längerer Krankheitsverlauf bei einem geringeren Eintrittsalter geschildert werden konnte (Capellari *et al.*, 1997). Studien mit transgenen Mäusen, die das Maus-PrP-Homolog mit 9 zusätzlichen Oktapeptiden synthetisieren, ermittelten bei den Tieren das Auftreten neuropathologischer Kennzeichen (u. a. cerebelläre Atrophie, Gliose, Körnerzellverlust) und ataktischer Störungen, sowie eine erhöhte Resistenz der PrP-Moleküle gegenüber sehr geringen Konzentrationen von PK (Chiesa *et al.*, 1998). Diese Resultate wurden als Bestätigung bereits existierender Zellkulturdaten dieser PrP-Mutante angesehen, da deren Expression in CHO-Zellen eine aberrante Membranassoziation und eine erhöhte PK-Resistenz und Detergenz-Unlöslichkeit offenbarte (Lehmann & Harris, 1995; 1996a, 1996b). In einer anderen Studie konnte für Hamster-PrP mit zusätzlichen 2, 4 und 6 Oktapeptiden unterschiedliche Ergebnisse bei der Expression in Maus-Fibroblasten- (NIH 3T3) und Maus-Neuroblastom-Zellen (N2a) beschrieben werden, wobei jedoch generell die Ausprägung eines abnormen Phänotyps mit der Anzahl der zusätzlichen Oktapeptide zunahm (Priola & Chesebro, 1998). So führte die Expression dieser PrP-Mutanten in 3T3-Zellen zu einer veränderten Oberflächen-Lokalisation, die in einer, mit der Anzahl der Oktapeptide korrespondierenden, zunehmend verringerten Ablösbarkeit der PrP-Moleküle durch PIPLC resultierte. Überraschenderweise zeigte jedoch in dieser Zelllinie neben den PrP-Mutanten auch der Wildtyp (mit insgesamt 5 Oktapeptiden) ein erhöhtes Aggregationsverhalten und eine Zunahme der PK-Resistenz. Diese Ergebnisse konnten in den N2a-Zellen nicht reproduziert werden, da die Expression der Mutanten in diesem Zelltyp keinerlei Unterschiede in der Oberflächen-Lokalisation offenbarte, dafür jedoch ein erhöhtes Aggregationsverhalten und eine Zunahme der PK-Resistenz ausschließlich bei den PrP-Mutanten mit zusätzlich 4 und 6 Oktapeptiden erbrachte. Ob diese disruenten Resultate dem Einsatz heterologer Modellsysteme (PrP-Gen und Zelllinie von verschiedenen Spezies) zu Grunde liegen, bleibt zu klären, durch den Einsatz der GFP-PrP-Chimären konnte jedenfalls erstmals im Gegensatz zu den oben beschriebenen „biochemischen“ Daten, der zelluläre Transport dieser Insert-Mutanten in lebenden N2a-Zellen beobachtet

werden. Dabei konnte durch den streng parallelen Versuchsansatz (identische Transfektionsbedingungen, identische Mikroskopeinstellungen) die bereits existierenden Daten bestätigt werden, dass mit zunehmender Oktapeptidzahl (über der Anzahl des Wildtyps hinaus) die Ausprägung eines aberranten Phänotyps zunimmt. In dieser Arbeit wurden PrP-Mutanten mit 5, 6 und 9 (GFP-mhPrP+5Op, GFP-mhPrP+6Op und GFP-mhPrP+9Op) zusätzlichen Oktapeptiden untersucht, die alle eine vergleichbare Glykosylierung zeigten und diesbezüglich keine Unterschiede zu GFP-wtPrP und GFP-mhPrP bzw. zu ihren homologen nativen PrP-Molekülen (ohne GFP; Lehmann & Harris, 1995; Priola & Chesebro, 1998) aufwiesen. Des weiteren konnte für die Wildtyp-Kontrolle, die ebenfalls wie die PrP-Insertmutanten humane PrP-Sequenzen im zentralen Bereich des Proteins trug, keinerlei Unterschiede zu GFP-wtPrP (enthält ausschließlich Maus-PrP) festgestellt werden, so dass die Integration humaner Sequenzen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, nicht zu einer generellen Beeinträchtigung des Transports bzw. der Prozessierung führte und somit in Zukunft auch für die Untersuchung weiterer humaner PrP-Mutationen durchgeführt werden kann. Die Beobachtung der Expression dieser PrP-Mutanten über die Zeit offenbarte für GFP-mhPrP+5Op und GFP-mhPrP+6Op ein verändertes Verteilungsmuster im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle auf der Zellmembran der N2a-Zellen. Sie zeigten in der mikroskopischen Analyse eine deutlich verringerte Membranständigkeit mit nur wenigen, über die Membran verteilten konzentrierteren Bereichen, die anhand der seriellen Aufnahmen durch die Zellen als „punktuellen“ Anreicherungen ausgemacht werden konnten. Da die Proteinsignale dieser Mutanten in der „Western blot“-Analyse nicht auf eine quantitative Beeinträchtigung der Biosynthese hindeuten, muss noch geklärt werden, ob die verringerte Signalstärke auf der Zellmembran für einen gestörten Transport der Moleküle zur Oberfläche oder möglicherweise für eine Unterdrückung der Fluoreszenzsignale auf Grund einer veränderten Membranassoziation bei einem Teil dieser PrP-Mutanten (Lehmann & Harris, 1995; 1996a, 1996b) sprechen. Eine signifikante Beeinträchtigung des Transports konnte jedenfalls für die Chimäre mit 9 zusätzlichen Oktapeptiden (GFP-mhPrP+9Op) festgestellt werden, für die eine intrazelluläre Akkumulation detektiert wurde, die vergleichbar zu der Lokalisation der Glykosylierungsmutanten (s. oben, GFP-PrP T182A, GFP-PrP T198A, GFP-PrP T182A/T198A) war. So konnte für diese glykosylierte PrP-Insertmutante (GFP-mhPrP+9Op) mit Hilfe des hier eingesetzten Modellsystems ein zelluläres Muster festgestellt werden, welches auch Glykosylierungs-defiziente GFP-PrP-Mutanten

offenbaren, deren Mutationen den „weit entfernten“ C-terminalen Bereich von PrP betrafen und deren Mutationen höchstwahrscheinlich mit der Ausbildung Struktur-determinierender, intramolekularer Wechselwirkungen interferieren (Riek *et al.*, 1998; Billeter & Wüthrich, 2000). Als plausible Erklärung dieser identischen zellulären Phänotypen könnte ein vergleichbarer Degradationspfad (Katabolismus) in Frage kommen, der möglicherweise das Erkennen dieser unkorrekt gefalteten PrP-Moleküle durch Qualitäts-Kontrollmechanismen im ER/Golgi (Ellgaard *et al.*, 1999) und die Degradation dieser Proteine innerhalb des ER widerspiegelt.

Durch den Einsatz des hier vorgestellten Modellsystems mit GFP-PrP-Chimären konnte also für eine Anzahl von PrP-Mutanten nicht nur bereits existierende Daten bestätigt werden, sondern auch neue Einblicke in die bislang noch nicht beschriebene Zellbiologie von TSE-assoziierten Prionproteinen gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene pathogene PrP-Mutanten unterschiedliche zelluläre Phänotypen aufzeigen und dass diese Unterschiede auch PrP-Mutanten aufweisen, die derselben klassifizierten Form (GSS, FFI, familiäre CJD) der vererbten Prionkrankheiten zugeordnet werden. Viele der untersuchten PrP-Mutanten zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Proteolyse mittels PK, welches im Rahmen der Prionhypothese als Kennzeichen der pathogenen Isoform angesehen wird.

Die uneinheitliche Einnahme verschiedener zellulärer Lokalisationen der PrP-Mutanten lässt in Verbindung mit den existierenden neuropathologischen Unterschieden innerhalb der Gruppe der familiären Prionkrankheiten (Windl & Kretzschmar, 2000) einen einfachen Funktionsverlust („loss of function“) der PrP-Mutanten als Ursache der vererbten TSEs als eher unwahrscheinlich erscheinen. Die hier präsentierten Daten führen hingegen zu einer Favorisierung verschiedener zytopathogener Mechanismen, die der Entstehung der klinisch-pathologischen Phänotypen der vererbten humanen Prionkrankheiten zu Grunde liegen.

5. Zusammenfassung

Etwa 10 % der gesamten Erkrankungsfälle der humanen TSEs werden durch die Gruppe der vererbaren Formen dieser Krankheiten repräsentiert, für die bislang in allen untersuchten Fällen Punktmutationen oder Insertionen im Prionprotein-Gen des Menschen (*PRNP*) nachgewiesen werden konnten. Obwohl bereits mehr als 20 TSE-assoziierte Mutationen in *PRNP* beschrieben wurden, ist nach wie vor relativ wenig über die Zellbiologie, d. h. den zellulären Transport bzw. die zelluläre Lokalisation dieser PrP-Mutanten bekannt. Aus diesem Grund wurde erstmalig ein Modellsystem mit homologen Maus-PrPs in der vielfach eingesetzten Maus-Neuroblastom-Zelllinie N2a etabliert, welches durch die Verwendung des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) als integrales Markerprotein in PrP eine direkte Beobachtung von PrP und PrP-Mutanten in lebenden Zellen ermöglichte. Es wurden insgesamt neben der Chimäre mit wt PrP und GFP weitere 14 Chimären hergestellt, von denen 11 mit PrP-Mutanten humaner, vererbbarer Prionkrankheiten korrespondierten. Die Ausweitung des Modellsystems auf die PrP-Mutanten wurde erst nach einer sorgfältigen Überprüfung der Chimäre mit wt PrP (GFP-wtPrP) vorgenommen, die zeigte, dass sich GFP-wtPrP in allen untersuchten Parametern wie natives PrP verhielt. Für die 11 TSE-assoziierten PrP-Mutanten konnten drei zelluläre Phänotypen identifiziert werden, die sich deutlich voneinander unterschieden. So konnte für bestimmte Missense- und Insert-Mutanten ein sekretorischer Transport wie bei der Wildtyp-Kontrolle festgestellt werden, mit einer Lokalisation der Proteine im Golgi-Apparat und auf der Zelloberfläche. Dem entgegen zeigten die zwei bislang beschriebenen, TSE-assoziierten Nonsense-Mutanten keinen Transport entlang eines sekretorischen Weges, sondern eine Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern. Als dritter Phänotyp konnte auf Grund einer Blockierung des sekretorischen Transports im Golgi-Apparat eine intrazelluläre Akkumulation im ER/Golgi sowohl für eine Missense-Mutante, deren Mutation zu einer Zerstörung des Sequenzmotivs für eine N-Glykosylierung führte als auch für eine Insert-Mutante, welche die bislang größte Insertion von zusätzlichen 9 Kopien eines Oktapeptids aufwies, detektiert werden.

Die mittels des Modellsystems identifizierten, unterschiedlichen Lokalisationen der PrP-Mutanten deuten darauf hin, dass die familiären Prionkrankheiten nicht einer einheitlichen, zellulären Aberration unterliegen, sondern höchstwahrscheinlich entlang mehrerer zytopathogener Routen ausgebildet werden.

6. Literaturverzeichnis

Alper, T., Haig, D. A. und Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 278-284.

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. und Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766.

Arnold, J. E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M. und Mayer, R. J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* 176, 403-411.

Bachmann, B. J. (1987) in: *E. coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology; Neidhardt, F. C. *et al.*, Hrsg., ASM, 1190-1219.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. und Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.

Bendheim, P. E., Barry, R. A., DeArmond, S. J., Stites, D. P. und Prusiner, S. B. (1984). Antibodies to a scapie prion protein. *Nature* 310, 418-421.

Bessen, R. A. und Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* 66, 2096-2101.

Bessen, R. A. und Marsh, R. F. (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68, 7859-7868.

Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375, 698-700.

- Billeter, M. und Wüthrich, K. (2000). The prion protein globular domain and disease-related mutants studied by molecular dynamics simulations. *Arch. Virol. Suppl.* 16, 251-263.
- Bjerrum, O.J. und Nielsen, C. S. (1986). Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with horizontal apparatus. *Electrophoresis*. VCH Publishers, Deerfield Beach, Fla., 315-327.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. und Huber, R. (1999) The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 295-317.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P. und Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.
- Bolton, D. C., Meyer, R. K. und Prusiner, S. B. (1985). Scrapie PrP is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Bolton, D. C., Rudelli, R. D., Currie, J. R. und Bendheim, P. E. (1991). Copurification of Sp33-37 and scrapie agent from hamster brain prior to detectable histopathology and clinical disease. *J. Gen. Virol.* 72, 2905-2913.
- Borchelt, D. R., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 16188-16199.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. und Aguzzi, A. (1996a). Normal host protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379, 339-346.
- Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blättler, T., Fischer, M., Weissmann, C. und Aguzzi, A. (1996b). Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13148-13151.

Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. und Kretzschmar, H. A. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. und Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by BSE agent. *Nature* 389, 498-501.

Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. und Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.-A., Autenried, P., Aguet, M. und Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. und Weissmann, C. (1994). High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol. Med.* 1, 19-30.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M und Short, J. M. (1987). XL-1 Blue : a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-378.

Butler, D. A., Scott, M. R. D., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K., Kingsbury, D. T. und Prusiner, S. B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* 62, 1558-1564.

Capellari, S., Vital, C., Parchi, P., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Pegoraro, E., Gambetti, P. und Julien, J. (1997). Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology* 49, 133-141.

Capellari, S., Parchi, P., Russo, C. M., Sanford, J., Sy, M. S., Gambetti, P. und Petersen, R. B. (2000). Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. Comparative study of a cell model and human brain. *Am. J. Pathol.* 157, 613-622.

Carlson, G. A., Kingsbury, D. T., Goodman, P. A., Coleman, S., Marshall, S. T., DeArmond, S., Westaway, D. und Prusiner, S. B. (1986). Linkage of prion protein and scrapie incubation time gene. *Cell* 46, 503-511.

Caughey, B., Race, R. E., Vogel, M., Buchmeier, M. J. und Chesebro, B. (1988). In vitro expression in eukaryotic cells of the prion protein gene cloned from scrapie-infected mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4657-4661.

Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. und Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 63, 175-181.

Caughey, B. und Raymond, G. J. (1991a). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 18217-18223.

Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D. und Race, R. E. (1991b). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): Implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* 65, 6597-6603.

Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. und Caughey, W. S. (1991c). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7680.

Caughey, B. (1993). Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture. *Br. Med. Bull.* 49, 860-872.

Caughey, B. und Chesebro, B. (1997). Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends in Cell Biology* 7, 56-62.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378-1379.
- Chardin, P. und McCormick, F. (1999). Brefeldin A: The advantage of being uncompetitive. *Cell* 97, 153-155.
- Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blättler, T., Aguzzi, A. und Kopp, N. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347, 1181.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., Garon, C. und Haase, A. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Caughey, B., Nishio, J., Ernst, D. und Race, R. (1993). Foreign PrP expression and scrapie infection in tissue culture cell lines. In Brown, F. (ed): *Transmissible Spongiform Encephalopathies - Impact on Animal and Human Health*. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger 80, 131-140.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. und Harris, D. A. (1998). Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21, 1339-1351.
- Cochran, E.J., Bennett, D.A., Cervenakova, L., Kenney, K., Bernard, B., Foster, N.L., Benson, D.F., Goldfarb, L.G. und Brown, P. (1996). Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a five-repeat octapeptide insert mutation. *Neurology* 47, 727-733.

Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C. L., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. und Jefferys, J. G. R. (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.

Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C. L., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J. und Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378, 779-783.

Collinge, J., Sidle, K. C. L., Meads, J., Ironside, J. und Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.

Come, J. H., Fraser, P. E. und Lansbury, P. T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5959-5963.

Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 57, 1-18.

Cuillé, J. und Chelle, P. L. (1936). Pathologie animale – La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ? *C. R. Acad. Sci. (III)* 203, 1552-1554.

Daude, N., Lehmann, S. und Harris, D. A. (1997). Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 272, 11604-11612.

DeArmond, S. J., Yang, S.-L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D. und Prusiner, S. B. (1993). Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6449-6453.

DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Dagget, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Trembley, P., Scott, M. R., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* 19, 1337-1348.

DeBurman, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B. und Lindquist, S. (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13938-13943.

Deslys, J. P., Lasmezas, C. I., Streichenberger, N., Hill, A., Collinge, J., Dormont, D. und Kopp, N. (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease in France. *Lancet* 349, 30-31.

Donaldson, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Bloom, G. S., Kreis, T. E. und Klausner, R. D. (1990). Dissociation of a 110 kDa peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J. Cell Biol.* 111, 2295-2306.

Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13452-13457.

Diringer, H., Gelderblom, H., Hilmert, H., Ozel, M., Edelbluth, C. und Kimberlin, R. H. (1983). Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* 306, 476-478.

Dürig, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Rosenthal, C., Schmücker, U., Bieschke, J., Dührsen, U. und Kretzschmar, H. A. (2000). Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br. J. Haematol.* 108, 488-495.

Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* 63, A1-A18.

Ellgaard, L., Molinari, M. und Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. und Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388.

Ferber, R. A., Wiesenfeld, S. L., Roos, R. P., Bobowick, A. R., Gibbs, C. J. und Gajdusek, D. C. (1974). Familial Creutzfeldt-Jakob disease: transmission of the familial disease to primates. In: Proceedings of the Xth International Congress of Neurology (Subirana, A. und Burrows J. M.; Hrsg.) Excerpta Medica, Amsterdam.

Finckh, U., Müller-Thomsen, T., Mann, U., Eggers, C., Marksteiner, J., Meins, W., Binetti, G., Alberici, A., Hock, C., Nitsch, R. M. und Gal, A. (2000). High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 110-117.

Fischer, M., Rüllicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. und Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15, 1255-1264.

Fischer, M. B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H. P. und Aguzzi, A. (2000). Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408, 479-483.

Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. und Prusiner, S. B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6617-6621.

Gabriel, J.-M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. und Prusiner, S. B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9097-9101.

Gajdusek, D. C. und Zigas, V. (1959). Kuru. Clinical, pathologic, and epidemiologic study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the eastern highlands of New Guinea. *Am. J. Med.* 26, 442-469.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. und Alpers, M. (1966). Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.

Gerstmann, J., Sträussler, E. und Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Neurol.* 154, 736-762.

Ghetti, B., Piccardo, P., Spillantini, M. G., Ichimiya, Y., Porro, M., Perini, F., Kitamoto, T., Tateishi, J., Seiler, C., Frangione, B., Bugiani, O., Giaccone, G., Prelli, F., Goedert, M., Dlouhy, S. R. und Tagliavini, F. (1996). Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with τ -positive neurofibrillary tangles: The phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 744-748.

Goldfarb, L.G, Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C. J. Jr. und Gajdusek, D. C. (1991). Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10926-10930.

Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A. C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W. W., Haltia, M., Wills, P. R., Hauw, J.-J., McKeever, P. E., Monari, L., Schrank, B., Swergold, G. D., Autilio-Gambetti, L., Gajdusek, D. C., Lugaresi, E. und Gambetti, P. (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258, 806-808.

Goldfarb, L. G., Brown, P., Little, B. W., Cervenakova, L., Kenney, K., Gibbs, C. J. Jr. und Gajdusek, D. C. (1993). A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 43, 2392-2394.

Gordon, W. S. (1946). Advances in veterinary research. Looping-ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet. Res.* 58, 516-525.

Gossen, M. und Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.

Griffith, J. S. (1967). Self-replication and Scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.

Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplov, D., Hood, L., Burlingame, A., Lycke, E., Kobata, A. und Prusiner, S. B. (1989). Asparagine-linked Glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 1-13.

Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harmey, J. H., Doyle, D., Brown, V. und Rogers, M. S. (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP^C, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N₂a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 753-759.

Harper, E. T. und Rose, G. D. (1993). Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box. *Biochemistry* 32, 7605-7609.

Herns, J. W., Kretzschmar, H. A., Titz, S. und Keller, B. U. (1995). Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2508-2512.

Hill, A. F., Antoniou, M. und Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J. Gen. Virol.* 80, 11-14.

Hölscher, C., Delius, H. und Bürkle, A. (1998). Overexpression of nonconvertible PrP^C Δ 114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP^{Sc} accumulation. *J. Virol.* 72, 1153-1159.

Hornshaw, M. P., McCermott, J. R. und Candy, J. M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 621-629.

Houston, F., Foster, J. D., Chong, A., Hunter, N. und Bostock, C. J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356, 999-1000.

Hsiao, K. K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. und Prusiner, S. B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straeussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.

Hsiao, K. K., Scott, M., Foster, D., Groth, D. F., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250, 1587-1590.

Hsiao, K. K., Groth, D. F., Scott, M., Yang, S. L., Serbam, H., Rapp, D., Foster, D., Torchia, M., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9126-9130.

Jaegly, A., Mouthon, F., Peyrin, J.-M., Camugli, B., Deslys, J.-P. und Dormont, D. (1998). Search for a nuclear localization signal in the prion protein. *Mol. Cell. Neurosci.* 11, 127-133.

Jakob, A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 64, 147-228.

Jarret, J. T. und Lansbury Jr., P. T. (1993). Seeding „one-dimensional crystallization“ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

Kaether, C. und Gerdes, H.-H. (1995). Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Letters* 369, 267-271.

Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10069-10074.

Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. und Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61, 3688-3693.

Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* 73, 1025-1029.

Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1992). Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 215-225.

Kimberlin, R. H., Walker, C. A. und Fraser, H. (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J. Gen. Virol.* 70, 2017-2025.

Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R. A., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1986). Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* 20, 204-208.

Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. und Tateishi J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 65, 6292-6295.

Kitamoto, T., Iizuka, R. und Tateishi, J. (1993). An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Straussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 525-531.

Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M. und Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390, 687-690.

Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C. und Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat. Med.* 4, 1429-1433.

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.

Kondoh, G., Gao, X. H., Nakano, Y., Koike, H., Yamada, S., Okabe, M. und Takeda J. (1999). Tissue-inherent fate of GPI revealed by GPI-anchored GFP transgenesis. *FEBS Lett.* 458, 299-303.

Kopito, R. R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88, 427-430.

Kramer, M. L., Kratzin, H. D., Schmidt, B., Romer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S. und Kretzschmar, H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.* 276, 16711-16719.

Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. und DeArmond S. J. (1986). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5, 315-324.

Kretzschmar, H. A., Honold, G., Seitelberger, F., Feucht, M., Wessely, P., Mehreain, P. und Budka, H. (1991). Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Sträussler, and Scheinker. *Lancet* 337, 1160.

Kretzschmar, H. A., Kufer, P., Riethmüller, G., DeArmond, S., Prusiner, S. B. und Schiffer, D. (1992). Prion protein mutation at codon 102 in an Italian family with Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Neurology* 42, 809-810.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Dormont, D., Robain, O., Orsini, J. und Hauw, J.-J. (1996a). BSE transmission to macaques. *Nature* 381, 743-744.

Lasmézas, C. I., Cesbron, J.Y., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Rioux, R., Lemaire, C., Loch, C. und Dormont, D. (1996b). Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *Virology* 70, 1292-1295.

Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.-M., Fournier, J.-G., Hauw, J.-J., Rossier, J. und Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275, 402-404.

Laszlo, L., Lowe, J., Self, T., Kenward, N., Landon, M., McBride, T., Farquhar, C., McConnell, I., Brown, J. und Hope, J. (1992). Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* 166, 333-341.

Lechardeur, D., Drzymala, L., Sharma, M., Zylka, D., Kinach, R., Pacia, J., Hicks, C., Usmani, N., Rommens, J. M. und Lukacs, G. L. (2000). Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J. Cell Biol.* 150, 321-334.

LeGendre, N. (1990). Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *BioTechniques* 9, 788-805.

Lehmann, S., Daude, N., Harris, D. A. (1997). A wild-type prion protein does not acquire properties of the scrapie isoform when coexpressed with a mutant prion protein in cultured cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 52, 139-145.

Lehmann, S. und Harris, D. A. (1995). A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270, 24589-24597.

Lehmann, S. und Harris, D. A. (1996a). Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cell. *J. Biol. Chem.* 271, 1633-1637.

Lehmann, S. und Harris, D. A. (1996b). Two mutant prion proteins expressed in cultures cells aquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5610-5614.

Lehmann, S. und Harris, D. A. (1997). Blockade of glycosylation promotes aquisition of Scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 272, 21479-21487.

Li, R., Liu, D., Zanusso, G., Liu, T., Fayen, J. D., Huang, J.-H., Petersen, R. B., Gambetti, P. und Sy, M.-S. (2001). The expression and potential function of the cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell. Immun.* 207, 49-58.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, S. und Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated wih brefeldin A: A evidence for membrane cycling from the Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813.

Lledo, P.-M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Nicoll, R. A. (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability ans synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2403-2407.

Locht, C., Chesebro, B., Race, R. und Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6372-6376.

Lorenz, H. (1997). Tetracyclin-regulierte Expression des Prionprotein-Gens der Maus. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.

Manetto, V., Medori, R., Cortelli, P., Montagna, P., Tinuper, P., Baruzzi, A., Rancurel, G., Hauw, J.-J., Vanderhaeghen, J.-J., Mailloux, P., Bugiani, O., Tagliavini, F., Bouras, C., Rizzuto, N., Lugaresi, E. und Gambetti, P. (1992). Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 42, 312-319.

Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. und Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8, 121-127.

Marksteiner, J., Veske, A., Piccardo, P., Ghetti, B. und Finckh, U. (1999). Novel nonsense mutation (Q160X) of the prion protein gene in early onset familial dementia. *medgen* 11, 455-456.

Masters, C. L., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104, 559-588.

McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Gonatas, N. (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* 65, 622-630.

McKnight, S. und Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805.

Medori, R., Tritschler, H.-J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P., Tinuper, P., Avoni, P., Mochi, M., Baruzzi, A., Hauw, J.-J., Ott, J., Lugaresi, E., Autilio-Gambetti, L. und Gambetti, P. (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med.* 42, 444-449.

- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. und Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 54, 63-74.
- Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A. und Prusiner, S. B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2310-2314.
- Meyer, N. Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72, 37-50.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* - a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1996). Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15457-15462.
- Muramoto, T., DeArmond, S. J., Scott, M., Telling, G. C., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1997). Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nat Med.* 3, 750-755.
- Nichols, B. J., Kenworthy, A.K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D. und Lippincott-Schwartz, J. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell. Biol.* 153, 529-541.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18, 6169.

Nitrini, R., Rosenberg, S., Passos-Bueno, M. R., Teixeira da Silva, L. S., Iughetti, P., Papadopoulos, M., Carrilho, P. M., Caramelli, P., Albrecht, S., Zatz, M. und LeBlanc, A. (1997). Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann. Neurol.*, 42, 138-146.

Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B. H., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. und Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.

Oppenheim, C., Brandel, J. P., Hauw, J. J., Deslys, J. P. und Fontaine, B. (2000). MRI and the second French case of vCJD. *Lancet* 356, 253-254.

Owen, F., Poulter, M., Shah, T., Collinge, J., Lofthouse, R., Baker, H., Ridley, R., McVey, J. und Crow, T. J. (1990). An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 7, 273-276.

Palmer, M.S. und Collinge, J. (1993). Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum. Mutat.* 2, 168-173.

Palmer, M. S., Mahal, S. P., Campbell, T. A., Hill A. F., Sidle, K. C., Laplanche, J. L. und Collinge, J. (1993). Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum. Mol. Genet.* 2, 541-544.

Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Servan, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10962-10966.

Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickinson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B. und Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 39, 767-778.

Parchi, P., Capellari, S., Chen, Petersen, R. B., Gambetti, P., Kopp, N., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Giese, A. und Kretzschmar, H. A. (1997). Typing prion isoforms. *Nature* 386, 232-233.

Parchi, P., Chen, S. G., Brown P., Zou, W., Capellari, S., Budka, H., Hainfellner, J., Reyes, P. F., Golden, G. T., Hauw, J. J., Gajdusek, D. C. und Gambetti, P. (1998). Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8322-8327.

Patankar, S., Fujioka, H. und Wirth, D. F. (2000). The signal sequence and C-terminal hydrophobic domain are required for localization of the sexual stage antigen pgs28 to the surface of *P. gallinaceum* ookinetes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 425-435.

Petersen, R. B., Parchi, P., Richardson, S. L., Urig, C. B. und Gambetti, P. (1996). Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J. Biol. Chem.*, 271, 12661-12668.

Prasher, D. C, Eckenrode, V. K. Ward, W. W., Pendergast, F. G. Und Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.

Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, J. M. und Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.

Priola, S. A. (1996). Similar protein signatures for BSE and vCJD. *Nat. Med.* 2, 1303-1304.

Priola, S. A. und Chesebro, B. (1998). Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *J. Biol. Chem.* 273, 11980-11985.

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. G., Bowman, K. A., Cochran, S. P. und McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942-6950.

Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F. und Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 38, 127-134.

Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. und Hood, L. E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38, 127-134.

Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.-M., Groth, D. F., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.-L., Serban, D., Carlson, G. A., Hoppe, P. C., Westaway, D. und DeArmond, S. J. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-686.

Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.

Prusiner, S. B. und DeArmond, S. J. (1994). Prion diseases and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 311-339.

Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363-13383.

Raymond, G. J., Hope, J., Kocisko, D. A., Priola, S., Raymond, L. D., Bossers, A., Ironside, J., Will, R. G., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Rubenstein, R., Smits, M. A., Lansbury Jr, P. T. und Caughey, B. (1997). Molecular assessment of the transmissibilities of BSE to humans. *Nature* 388, 285-288.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G₁/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1669-1679.

Ridley, R. M. und Baker, H. F. (1996). Variation on a theme of Creutzfeldt-Jakob disease: Implications of new cases with a young age at onset. *J. Gen. Virol.* 77, 2895-2904.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. und Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-182.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. und Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231). *FEBS Lett.* 413, 282-288.

Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R. und Wüthrich, K. (1998). Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11667-11672.

Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. und Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5, 635-642.

Rogers, M., Taraboulos, A., Scott, M., Groth, D. und Prusiner, S. B. (1990). Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology* 1, 101-109.

Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M. und Prusiner, S. B. (1993). Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3182-3186.

Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A. und Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13044-13049.

- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. und Dwek, R. A. (2001). Prion glycoprotein: Structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40, 3759-3766.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J. (1993). Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Prot. Sci.* 2, 2206-2216.
- Saiki, R. K., Gelfland, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. und Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature* 380, 528-531.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sanger, F. und Coulson, A. R. (1978). The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.* 87, 107-110.
- Schätzl, H. M., DaCosta, M., Taylor, L., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1995). Prion protein variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245, 362-374.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Wälchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D. und Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.

Scott, M. R., Köhler, R., Foster, D. und Prusiner, S. B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Prot. Sci.* 1, 986-997.

Scott, M. R., Will, R., Ironside, J. W., Nguyen, H.-O. B., Tremblay, P., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15137-15142.

Shyng, S.-L., Huber, M. T. und Harris, D. A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 15922-15928.

Simon, S., Krejci, E. und Massoulie, J. (1998). A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *EMBO J.* 17, 6178-6187.

Simonova, M., Weissleder, R., Sergeyev, N., Vilissova, N. und Bogdanov, A. Jr. (1999). Targeting of green fluorescent protein expression to the cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 638-642.

Spector, D. L., Goldman, R. D. und Leinwand, L. A. (1998). Cells. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. und Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.

Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L. und Prusiner, S. B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991-2002.

Stimson, E., Hope, J., Chong, A. und Burlingame, A. L. (1999). Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38, 4885-4895.

Tagliavini, F., Prelli, F., Porro, M., Salmona, M., Bugiani, O. und Frangione, B. (1992). A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: Implications for prion-related encephalopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1398-1404.

Taraboulos, A., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1990). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell Biol.* 110, 2117-2132.

Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 851-863.

Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avraham, D., Laszlo, L. und Prusiner, S. B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129, 121-132.

Tateishi, J., Brown, P., Kitamoto, T., Hoque, Z. M., Roos, R., Wollman, R., Cervenakova, L. und Gajdusek, D. C. (1995). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376, 434-435.

Tateishi, J. und Kitamoto, T. (1995). Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain. Pathol.* 5, 53-59.

Tatzelt, J., Prusiner, S. B. und Welch, W. J. (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15, 6363-6373.

Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.

Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. und Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-2082.

Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rüdliche, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. und Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.

Tobler, I., Deboer, T. und Fischer, M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J. Neuroscience* 17, 1869-1879.

Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Towbin, H. und Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 72, 313.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G. W., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14945-14949.

Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J. (1999). Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2042-2047.

Wacker, I., Kaether, C., Krömer, A., Migala, A., Almers, W. und Gerdes, H.-H. (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J. Cell Sci.* 110, 1453-1463.

Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651-662.

Westaway, D., Mirenda, C. A., Foster, D., Zabarjardian, Y., Scott, M., Torchia, M., Yang, S. -L., Serban, H., DeArmond, S. J., Ebeling, C., Prusiner, S. B. und Carlson, G. A. (1991). Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron* 7, 59-68.

White, J. und Stelzer, E. (1999). Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in Cell Biology* 9, 61-65.

Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. und Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom. *Lancet* 347, 921-925.

Wilson, C. M. (1983). Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Meth. Enzymol.* 91, 236-247.

Windl, O., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Skworc, K., Arendt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S. and Kretzschmar, H. A. (1999). Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum. Genet.* 105, 244-252.

Windl, O., Lorenz, H., Behrens, C., Roemer, A. und Kretzschmar, H. A. (1999). Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein. *J. Gen. Virol.* 80, 15-21.

Windl, O. und Kretzschmar, H. A. (2000). 'Prion diseases' in Neurogenetics (ed.: S.-M. Pulst). Contemporary Neurology Series 57, 191-218, Oxford University Press, New York, Oxford.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17, 3469-3478.

Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. und Schätzl, H. M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* 289, 1163-1178.

Yanai, A., Meiner, Z., Gahali, I., Gabizon, R. und Taraboulos, A. (1999). Subcellular trafficking abnormalities of a prion protein with a disrupted disulfide loop. *FEBS Lett.* 460, 11-16.

Zanusso, G., Liu, D., Ferrari, S., Hegyi, I., Yin, X., Aguzzi, A., Hornemann, S., Liemann, S., Glockshuber, R., Manson, J. C., Brown, P., Petersen, R. B., Gambetti, P. und Sy, M.-S. (1998). Prion protein expression in different species: Analysis with a panel of new mAbs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8812-8816.

Zanusso, G., Petersen, R. B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., Gambetti, P. und Singh, N. (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J. Biol. Chem.* 274, 23396-23404.

Zeidler, M. und Ironside, J. W. (2000). The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Rev. Sci. Tech.* 19, 98-120.

7. Internetseiten

Daten des britischen Gesundheitsministeriums zu aktuellen CJD- und BSE-Statistiken findet man unter:

www.doh.gov.uk/cjd

Information zur Prionforschung im Institut für Neuropathologie, München, findet man unter:

www.med.uni-muenchen.de/neuropathologie

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. A. Kretzschmar danke ich für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und für das Vertrauen, welches mir ermöglichte meine wissenschaftlichen Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer danke ich für die interessierte und sehr freundliche Art, mit der er die Betreuung meiner Arbeit nach dem Umzug von Göttingen nach München übernommen hat.

Bei Dr. Otto Windl bedanke ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche und die vielen hilfreichen Literaturhinweise, sowie für sein stets vorhandenes Interesse an meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Malte Buchholz, der besonders zu Beginn dieser Arbeit durch unsere ausgiebig geführten Diskussionen mein Interesse an der Prionbiologie, aber auch an allgemeinen wissenschaftlichen Fragestellungen sehr geweckt hat.

Mein Dank gilt ferner allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Andreas Besinger, Prof. Dr. Jochen Herms, Dr. Armin Giese, Christiane Wegner, Stefanie Arendt, Christina Oberdieck, Meike Barche, Peter Schürmann, Elzbieta Staniszewski und Stefanie Lange, für das gute Arbeitsklima und den Spaß bei der Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt selbstverständlich meiner Familie, auf deren liebevolle Unterstützung ich mich stets verlassen kann.

Lebenslauf

Holger Lorenz

26.01.1971	geboren in Northeim
1977-1981	Besuch der Grundschule Gieboldehausen
1981-1983	Besuch der Orientierungsstufe Gieboldehausen
1983-1990	Besuch der RS Gieboldehausen und des Arnoldi-Gymnasiums Göttingen
1990	Abitur
1990-1991	Grundwehrdienst in Northeim und Leer
1991	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Studienfach Biologie (Diplom)
1993	Diplomvorprüfung in den Fächern Molekulare Genetik, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
1996	Diplomprüfung in den Fächern Molekulare Genetik, Entwicklungsbiologie und Physikalische Chemie
1996-1997	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. H. A. Kretzschmar mit dem Thema „Tetracyclin-regulierte Expression des Prionprotein-Gens der Maus“
Dezember 1997	Diplom im Studiengang Biologie
Januar 1998	Beginn der Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen
Juli 2000	Umzug der Neuropathologie (Prof. Dr. H. A. Kretzschmar) und Fortsetzung der Arbeit am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians- Universität München